

Phytochemische Untersuchung des phenolischen Inhaltsstoffspektrums in *Salix* Spezies unter besonderer Berücksichtigung der Flavan-3-ole



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg

vorgelegt von

Stefan Christian Wiesneth

aus Auerbach i. d. Opf.

im Jahr 2017

*Meiner ganzen Familie und
besonders meiner
Frau Katharina*

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2013 bis September 2017 unter der Leitung von PD Dr. Guido Jürgenliemk am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Regensburg angefertigt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 13.09.2017

Wissenschaftliches Kolloquium am: 22.12.2017

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Siavosh Mahboobi, Universität Regensburg

Erstgutachter: PD Dr. Guido Jürgenliemk, Universität Regensburg

Zweitgutachter: Prof. Dr. Andreas Hensel, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Drittprüfer: Prof. Dr. Jörg Heilmann, Universität Regensburg

Danksagungen

An erster Stelle möchte ich meinem Betreuer und Doktorvater PD Dr. Guido Jürgenliemk danken, dass er mich als seinen Doktoranden angenommen hat. Er hatte immer ein offenes Ohr und stand mir jederzeit mit einem Rat zur Seite. Vielen Dank für die stets offene Tür und deine Freundschaft. Vielen Dank auch für die tollen botanischen Exkursionen, an denen ich mehrfach teilnehmen durfte.

Auch Prof. Dr. Jörg Heilmann gilt mein besonderer Dank dafür, dass er mich in seinem Arbeitskreis aufgenommen hat und somit diese Arbeit ermöglichte. Aber auch seine fachlichen Anregungen, sein Verständnis und seine Freundschaft waren immer sehr wertvoll für mich.

Ohne Prof. Dr. Sigurd Elz wäre dieses Vorhaben gar nicht möglich gewesen. Ich danke Ihnen für die Finanzierung meiner Stelle, die Möglichkeit in Ihren Praktika mitzuwirken und für die Unterstützung, die ich zu jeder Zeit durch Sie erfahren habe.

Herzlichen Dank auch an PD Dr. Gregor Aas (Universität Bayreuth). Durch ihn wurde das in dieser Arbeit vorgestellte Screening Projekt bzgl. verschiedener Weiden erst möglich.

Prof. Dr. Andreas Hensel (Universität Münster) gilt für das Übernehmen der Gutachterfunktion für diese Arbeit ebenfalls mein besonderer Dank. Aber auch für die Möglichkeit im Jahr 2013 in seiner Arbeitsgruppe Erfahrungen zur Analytik von Proanthocyanidinen sammeln zu dürfen und für die Unterstützung, die ich im Laufe der Jahre durch ihn erfahren habe.

Dr. Frank Petereit (Universität Münster) sei herzlich für die hervorragende Zusammenarbeit in dem Projekt zur Isolierung und Charakterisierung der Proanthocyanidine aus *Salix daphnoides* VILL. gedankt. Er hatte für die analytischen Probleme stets ein offenes Ohr und stand mit guten Ratschlägen zur Seite. Darüber hinaus möchte ich ihm noch für die Betreuung während meines kurzfristigen Forschungsaufenthalts an der Universität Münster danken.

Dr. Marcus Lautenschläger möchte ich für meine phantastischen zwei Wochen in Münster und die hervorragende Zusammenarbeit und Integration während dieser Zeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Hensel danken.

Ohne Gabriele Brunner hätte vermutlich im Labor gar nichts funktioniert. Daher möchte ich ihr besonders danken für all das vermittelte praktische Wissen, die tatkräftige Unterstützung in allen Projekten und die Geduld, die sie mir stets entgegenbrachte.

Vielen Dank an Anne Grashuber für all die praktische Unterstützung und das Bereitstellen einiger von ihr hergestellten Chemikalien.

Herzlichen Dank an PD Dr. Birgit Kraus für ihre Unterstützung während meiner kurzen Ausflüge in die Zellkultur.

Dr. Monika Untergehrer gilt mein besonderer Dank für die gute Zusammenarbeit während der Extraktion der Rinde der *S. daphnoides* und für eine phantastische gemeinsame Zeit am Lehrstuhl.

Vielen Dank an Christian Zeh für die Vorkorrektur dieser Arbeit, für die tolle gemeinsame Zeit und für seine Freundschaft.

PD Dr. Ilya Shenderovic gilt mein besonderer Dank für die Ausarbeitung und Optimierung des HMBC-Experiments im Zusammenhang mit 2,3-*cis* konfigurierten Flavan-3-olen.

Vielen Dank an Annette Schramm, Georgine Stühler und besonders Fritz Kastner aus der NMR-Abteilung der Fakultät Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg. Durch die von ihnen durchgeführten NMR-Experimente konnte die Strukturaufklärung und Charakterisierung erst ermöglicht werden.

Herzlichen Dank an Wolfgang Söllner und insbesondere Josef Kiermaier aus der massenspektrometrischen Abteilung der Fakultät Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg. Ohne die durch sie generierten Daten hätten wichtige Bausteine zur Realisierung dieser Arbeit gefehlt.

PD Dr. Axel Dürkop möchte ich das Aufnehmen der CD-Spektren der isolierten Verbindungen und mit Proanthocyanidinen angereicherten Fraktionen danken.

Der Firma PhytoLab GmbH gilt mein Dank für das Bereitstellen des Drogenmaterials der Rinde der *Salix daphnoides* VILL. für das Isolierungsprojekt und für das Bereitstellen der kostenlosen (-)-Epicatechin Referenz.

Vielen Dank an Dr. Steffen Pockes und das ganze Team für die hervorragende Zusammenarbeit in der Praktikumsbetreuung und eine phantastische gemeinsame Zeit.

Vielen Dank an all die Helfer bei den Probenzügen während des Screening-Projekts: Gabriele Brunner, Sebastian Schwindl, Julianna Ziegler, Sina Malenke, Katrin Kuck, Martina Jünger, Martina Tremmel, Vera Salwey, Martin Nagel, Diandra Pintač (Universität Novi Sad), Gabriele

Brey und Gudrun Hauschulz (beide Universität Bayreuth). Mein besonderer Dank gilt dabei Frau Hauschulz und Frau Brey für die Trocknung des gesammelten Pflanzenmaterials.

Vielen Dank an Dr. Sabine Trupp (Fraunhofer EMFT) für das Bereitstellen des UPLC®-Equipments. Ohne diese Geräte wäre eine Realisierung des Screening-Projekts in dieser Form nicht möglich gewesen.

Vielen Dank an all die Studenten und Studentinnen, die während ihrer Wahlpflichtpraktika an diesen Projekten mitgewirkt haben.

Herzlichen Dank an alle meine ehemaligen und aktuellen Kollegen und Kolleginnen Markus Löhr, Dr. Sebastian Schmidt, Dr. Marcel Flemming, Dr. Daniel Bücherl, Dr. Rosmarie Scherübl, Dr. Petr Jirásek, Dr. Monika Untergehrer, Dr. Tri Hieu Nguyen, Dr. Beata Kling, Dr. Edna Makule, Christian Zeh, Eva Lotter, Dr. Ilya Volkov, Katharina Schiller, Julianna Ziegler, Bernhard Kram, Sina Malenke, Sebastian Schwindl und Katrin Kuck. Ich werde all die lustigen und fröhlichen Momente mit euch niemals vergessen.

Besonders möchte ich Markus Löhr danken. In ihm habe ich einen sehr guten, wertvollen Freund und meinen Trauzeugen gefunden. Ich danke ihm für all die guten Gespräche, das offene Ohr und die Geduld, die er mir immer entgegenbrachte und entgegenbringt.

Vielen Dank an all meine Freunde, die zu zahlreich sind um sie alle zu nennen. Ihr seid wichtiger Bestandteil meines Lebens und ich danke euch für all die guten gemeinsamen Erinnerungen und freue mich auf die tollen Zeiten, die noch kommen werden.

Vielen Dank auch an meinen Bruder Markus Wiesneth, der immer ein offenes Ohr für mich hat, und für seine brüderliche Liebe, die er mir entgegenbringt.

Danken möchte ich auch meinen Schwiegereltern Walter und Christine Berger, meiner Schwägerin Stefanie Berger und meinem Schwager Martin Berger, die mich als Teil ihrer Familie akzeptieren und aufgenommen haben.

Große Dankbarkeit empfinde ich gegenüber meinen Eltern Lydia und Bernd Wiesneth, die mir überhaupt erst meine Ausbildung ermöglicht haben und mich während meines ganzen Lebens ohne jede Einschränkung unterstützen. Herzlichen Dank für alles, was ihr mir entgegengebracht habt.

Danksagungen

Zu guter Letzt möchte ich ganz besonders dem wichtigsten Menschen in meinem Leben danken – meiner Frau Katharina. So hat sie mir all das Wissen um die Statistikprogrammiersprache R vermittelt und damit einen Teil der Auswertung der NMR-Metabolomstudie ermöglicht. Viel wertvoller und unbezahlbar ist jedoch die Liebe, die sie mir schenkt, und all die emotionale Unterstützung, die ich durch sie erfahre. Durch sie fühle ich mich erst vollständig.

Beiträge zur Wissenschaft

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen in Peer Review Journals

Wiesneth, S.; Aas, G.; Heilmann, J. und Jürgenliemk, G. Investigation of the flavan-3-ol patterns in ten willow species during one growing-season. *Phytochemistry*, 2018, 145, 26-39.
doi: 10.1016/j.phytochem.201710.001.

Wiesneth, S. und Jürgenliemk, G. Total phenolic and tannins determination: a modification of Ph. Eur. 2.8.14 for higher throughput. *Pharmazie*, 2017, 72, 195-196.
doi: 10.1691/ph.2017.6911.

Wiesneth, S.; Petereit, F. und Jürgenliemk, G. *Salix daphnoides*: a screening for oligomeric and polymeric proanthocyanidins. *Molecules*, 2015, 20, 13764-13779.
doi: 10.3390/molecules200813764.

Konferenzbeiträge

Vorträge*:

International PhD students/Postdocs meeting of the German Pharmaceutical Society (DPhG), 2017, Frankfurt am Main, Deutschland:

Wiesneth, S.*; Aas, G.; Heilmann, J. und Jürgenliemk, G. Comparative investigation of the flavan-3-ol patterns in two willows during one growing season.

3. Doktorandenkolleg der WALA Heilmittel GmbH (PhD students meeting), 2016, Bad Boll / Eckwälden, Deutschland:

Wiesneth, S. Polyphenole aus *Salix* – Neue Teile im phytochemischen Puzzle.

4. Young Researcher Meeting, 2015, Münster, Deutschland:

Wiesneth, S.*; Petereit, F. und Jürgenliemk, G. Polymere Proanthocyanidine aus der Rinde von *Salix daphnoides*.

Posterpräsentationen*:

Annual Meeting of the German Pharmaceutical Society (DPhG), 2016, München, Deutschland:

Wiesneth, S.*; Heilmann, J. und Jürgenliemk, G. Total phenolic and tannins determination: a modification of Ph. Eur. 2.8.14 suitable for high-throughput screenings.

7th International Conference on Polyphenols and Health (ICPH), 2015, Tours, Frankreich:

Wiesneth, S.*; Petereit, F. und Jürgenliemk, G. *Salix daphnoides*: a screening for oligomeric and polymeric flavan-3-ols.

* präsentierender Autor

Lebenslauf

Ausbildung:

- 03/2013 – 09/2017 **Universität Regensburg, Deutschland**
Doktorarbeit am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Prof. Dr. Jörg Heilmann
- seit 04/2016 **Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik**
- 11/2012 **Approbation als Apotheker**
- 10/2007 – 10/2011 **Universität Regensburg, Deutschland**
Pharmaziestudium (2. Staatsexamen: 1,00)
- 08/1997 – 06/2006 **Herzog-Christian-August-Gymnasium,
Sulzbach-Rosenberg, Deutschland**
Allgemeine Hochschulreife (Abschlussnote: 2,2)
- 08/1993 – 07/1997 **Pestalozzi Grundschule, Sulzbach-Rosenberg, Deutschland**

Berufliche Erfahrungen:

- seit 03/2013 **Universität Regensburg, Deutschland**
Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter zur Praktikumsbetreuung am Lehrstuhl für Medizinische Chemie I, Prof. Dr. Sigurd Elz
- 01/2013 – 05/2015 **Apotheke im BUZ, Burgweinting, Deutschland**
Anstellung als Apotheker
- 12/2012 **Krankenhausapotheke des Universitätsklinikums Regensburg,
Deutschland**
Elternschaftsvertretung als Apotheker
- 11/2011 – 10/2012 **Pharmazeut im Praktikum**
- Krankenhausapotheke des Universitätsklinikums Regensburg, Deutschland
- Markt Apotheke, Lappersdorf, Deutschland
- 08/2010 **St. Anna Apotheke, Sulzbach-Rosenberg, Deutschland**
Studentenjob
- 11/2009 – 09/2007 **Universität Regensburg, Deutschland**
Anstellung als studentische Hilfskraft zur Unterstützung in der Praktikumsbetreuung am Lehrstuhl für Medizinische Chemie I, Prof. Dr. Sigurd Elz
- 05/2007 – 09/2007 **St. Anna Apotheke, Sulzbach-Rosenberg, Deutschland**
Praktikantentätigkeit
- 08/2006 – 04/2007 **Regens-Wagner-Stiftung, Michelfeld, Deutschland**
Zivildienst

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	i
Beiträge zur Wissenschaft	v
Publikationen in Peer Review Journals	v
Konferenzbeiträge	v
Lebenslauf.....	vi
Inhaltsverzeichnis.....	vii
1 Abkürzungsverzeichnis.....	xii
2 Einleitung	1
2.1 Die pharmazeutische Bedeutung der Weiden und Proanthocyanidine	2
2.2 Die ökologische Bedeutung der Weiden und Proanthocyanidine	6
2.3 Die phenolischen Hauptinhaltsstoffgruppen in Weiden.....	8
2.4 Vorstellung der für diese Arbeit relevanten <i>Salix</i> Spezies	12
2.4.1 <i>Salix pentandra</i> L.....	14
2.4.2 <i>Salix fragilis</i> L.....	16
2.4.3 <i>Salix alba</i> L.....	18
2.4.4 <i>Salix caprea</i> L.....	20
2.4.5 <i>Salix cinerea</i> L.....	22
2.4.6 <i>Salix caprea</i> x <i>cinerea</i>	23
2.4.7 <i>Salix dasyclados</i> WIMM.....	25
2.4.8 <i>Salix elaeagnos</i> SCOP.	27
2.4.9 <i>Salix daphnoides</i> VILL.....	29
2.4.10 <i>Salix repens</i> L.....	31
2.4.11 <i>Salix purpurea</i> L.....	33
2.5 Zielsetzung	36
3 Isolierung phenolischer Verbindungen aus <i>Salix daphnoides</i> VILL.	37
3.1 Hintergrund.....	37

3.2	Isolierung oligomerer Procyanidine.....	38
3.2.1	Isolierungsstrategie	38
3.2.2	Procyanidin B1.....	41
3.2.3	Procyanidin B2.....	47
3.2.4	Procyanidin B3.....	51
3.2.5	Procyanidin B4.....	57
3.2.6	Procyanidin B5.....	61
3.2.7	Procyanidin B7.....	65
3.2.8	Procyanidin C1.....	70
3.2.9	Epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin.....	75
3.2.10	Epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin.....	79
3.2.11	Catechin-(4 α →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin	83
3.2.12	Charakterisierung weiterer isolierter oligomerer Procyanidine	91
3.3	Isolierung des Chalkons 6'- <i>O-trans-p</i> -Cumaroylisalipurposid	95
3.4	Diskussion	98
3.5	Zusammenfassung.....	100
3.6	Experimenteller Teil.....	101
3.6.1	Verbrauchsmaterial und Chemikalien.....	101
3.6.2	Extraktionsverfahren	101
3.6.3	Dünnschichtchromatographie	102
3.6.4	Säulenchromatographie an Sephadex® LH-20	103
3.6.5	Säulenchromatographie an MCI-Gel® CHP20P	104
3.6.6	Präparative HPLC-Methoden	105
3.6.7	Peracetylierung dimerer Procyanidine	108
3.6.8	NMR-spektroskopische Verfahren.....	109
3.6.9	Massenspektrometrie.....	110
3.6.10	Circulardichroismus	110
3.6.11	Polarimetrische Untersuchungen	110

3.6.12	Elementaranalyse	111
4	Charakterisierung zweier mit Proanthocyanidinen angereicherten Fraktionen aus <i>Salix daphnoides</i> VILL.	112
4.1	Hintergrund.....	112
4.2	Aufarbeitung der beiden Fraktionen	113
4.2.1	Anreicherungsverfahren	113
4.2.2	Charakterisierung und Vergleich der beiden Fraktionen	114
4.3	Diskussion	123
4.4	Zusammenfassung.....	124
4.5	Experimenteller Teil.....	125
4.5.1	Verbrauchsmaterial und Chemikalien.....	125
4.5.2	Anreicherung der Proanthocyanidine aus Fraktion S.d. S2 via Centrifugal Partition Chromatography	125
4.5.3	Gesamtgerbstoffbestimmung nach Ph. Eur. 2.8.14.....	126
4.5.4	Proanthocyanidinspaltung in Gegenwart von Phloroglucinol	128
4.5.5	Bestimmung des mDP über einen thiolytischen Abbau.....	129
4.5.6	Quantifizierung des Gesamt-Procyanidin-Gehalts nach der Monographie Weißdornfrüchte des Ph. Eur. und Ermittlung der verlängernden Einheiten als deren Anthocyanidine (HCl/O ₂ -Spaltung).....	133
4.5.7	NMR-Spektroskopische Verfahren.....	135
4.5.8	Circular dichroismus	136
4.5.9	Polarimetrische Untersuchungen	136
5	Anpassung der Methode 2.8.14 des Ph. Eur. für einen größeren Probendurchsatz	137
5.1	Hintergrund.....	137
5.2	Entwicklung und Validierung der Methode	138
5.3	Diskussion	144
5.4	Zusammenfassung.....	145
5.5	Experimenteller Teil.....	146
5.5.1	Verbrauchsmaterial und Chemikalien.....	146

5.5.2	Probenvorbereitung	146
5.5.3	Modifizierte Methode zur Gesamtphenol- und Gesamtgerbstoffbestimmung in Anlehnung an die Methode 2.8.14 des Ph. Eur.	147
5.5.4	Ermittlung der Kalibriergeraden und Überprüfen der Linearität und Streuung .	148
5.5.5	Ermittlung LOD und LOQ	149
5.5.6	Statistische Tests	149
6	Analytische Pilotstudie zum Vergleich des phenolischen Inhaltsstoffspektrums mehrerer Weidenarten innerhalb einer Wachstumsperiode.....	150
6.1	Hintergrund.....	150
6.2	Ergebnisse.....	156
6.2.1	Vergleichende Bewertung der Gesamtphenole und -gerbstoffe	156
6.2.2	Vergleichende Bewertung der Flavan-3-ol-Muster	158
6.2.2.1	Erfassung der gesamten Flavan-3-ole über eine RP-18 UPLC®-Methode .	158
6.2.2.2	Quantifizierung der monomeren Flavan-3-ole Catechin und Epicatechin .	166
6.2.2.3	Erfassung der Proanthocyanidine via einer DIOL-UPLC®-Methode	168
6.2.2.4	Erfassung der Minima und Maxima der Proanthocyanidine während des Untersuchungszeitraums	171
6.2.2.5	Betrachtung des Anteils oligomerer Proanthocyanidine innerhalb der Gesamt-Proanthocyanidine	173
6.2.2.6	Betrachtung der Proanthocyanidinmuster.....	175
6.2.3	Vergleichende Bewertung der Salicylalkoholderivate	181
6.2.4	Vergleichende Bewertung der Phenylpropansäuren	188
6.2.5	Vergleichende Bewertung der Flavanone	195
6.2.6	Vergleichende Bewertung der Flavonoide und Chalkone.....	202
6.2.7	Stoffgruppenübergreifende Betrachtungen.....	209
6.2.8	Qualitative Untersuchung in Bezug auf mögliche Markersubstanzen 6“- <i>O-trans-p</i> -Cumaroylisosalipurposid und Catechin-3- <i>O</i> -(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure)-ester.....	217
6.2.9	Vergleichende Bewertung der NMR-Fingerprints der Blätter	219

6.3	Diskussion	230
6.3.1	Flavan-3-ole unter besonderer Berücksichtigung der Proanthocyanidine	230
6.3.2	Salicylalkoholderivate	232
6.3.3	Phenylpropansäuren	235
6.3.4	Flavanone und Flavonoide / Chalkone	236
6.3.5	Stoffgruppenübergreifende Betrachtungen	238
6.4	Zusammenfassung	240
6.5	Experimenteller Teil	242
6.5.1	Verbrauchsmaterial und Chemikalien	242
6.5.2	Pflanzenmaterial	242
6.5.3	Trocknung des Pflanzenmaterials	243
6.5.4	Probenvorbereitung	244
6.5.5	UPLC®-Methode zur Quantifizierung der Proanthocyanidin-Cluster	244
6.5.6	UPLC®-Methode zur Quantifizierung der sonstigen phenolischen Inhaltsstoffe	246
6.5.7	Massenspektrometrische Untersuchung zur Identifizierung der möglichen Markersubstanzen 6‘‘- <i>O-trans-p</i> -Cumaroylisosalipurposid und Catechin-3- <i>O</i> -(1- hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure)-ester	249
6.5.8	Gesamtphenol- und Gesamtgerbstoffbestimmung	250
6.5.9	NMR-Spektroskopie und statistische Auswertung mittels Hauptkomponentenanalyse	251
7	Abschließende Zusammenfassung	254
	Summary	255
8	Literaturverzeichnis	257

1 Abkürzungsverzeichnis

♂	männlich, Männchen
♂♂	mehrere Männchen
♀	weiblich, Weibchen
♀♀	mehrere Weibchen
1D	eindimensional
¹³ C	Kohlenstoffisotop mit der Atommasse 13u
¹⁴ C	radioaktives Kohlenstoffisotop mit der Atommasse 14u
¹ H	Wasserstoffisotop mit der Atommasse 1u
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
$[\alpha]_{589}^T$	spezifischer Drehwert bei 589 nm und der angegebenen Temperatur T [°C]
AA	Anisaldehyd
AA/H ₂ SO ₄	Anisaldehyd/Schwefelsäure Sprühreagenz
Abb.	Abbildung
AUC	Area Under the Curve (Fläche unter der Kurve)
Aug.	August
bs	breites Singulett
Bsp.	Beispiel
bzgl.	bezüglich
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
ca.	circa
calcd.	calculated (berechnet, hier: die theoretische hochauflösende Masse für ein Massefragment)
CD	Circulardichroismus
CDCl ₃	deuteriertes Chloroform
cGMP	zyklisiertes Guanosinmonophosphat
CN	Cyano
COSY	Correlation Spectroscopy
COX-2	Cyclooxygenase-2
CPC	Centrifugal Partition Chromatography (Zentrifugalverteilungschromatographie)
d	Dublett
δ	chemische Verschiebung
xii	

dd	Dublett vom Dublett
D	Wasserstoffisotop mit der Atommasse 2u (Deuteriumatom)
D ₂ O	deutertes Wasser (H ₂ O- <i>d</i> ₂)
DAD	Diode-Array-Detector (Diodenarraydetektor)
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> ₆	vollständig deutertes Dimethylsulfoxid
DP	Polymerisationsgrad
ESI	Elektrosprayionisation
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
F1	erste Filialgeneration
F2	zweite Filialgeneration
FA	Ameisensäure
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GPL	Gesamtphenollösung
H ⁺	Proton
H ₂ O	Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HaCaT	humane Keratinozyten Zelllinie
HCl	Salzsäure
HOAc	Ameisensäure
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMPC	Committee on Herbal Medicinal Products (Komitee für pflanzliche Arzneiprodukte)
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungs-Flüssigchromatographie)
HPTLC	High performance thinlayer chromatography (Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie)
HRMS	High resolution mass spectrometry (Hochauflösende Massenspektrometrie)
HRMS/MS	hochauflösende Tandemmassenspektrometrie
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HT-29	Humane kolorektale Adenocarcinomzellen

Abkürzungsverzeichnis

ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1 (Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1)
Int. Std.	Interner Standard
K	Grad Kelvin
L	Liter
λ_{em}	Emmissionswellenlänge in der Fluorimetrie
λ_{ex}	Anregungswellenlänge in der Fluorimetrie
LOD	Limit of detection (Detektionslimit)
LOQ	Limit of quantification (Quantifizierungslimit)
m	Multiplett
m/m	Massenanteile
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
mDP	durchschnittlicher Polymerisationsgrad
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MeOH- <i>d</i> ₄	vollständig deuteriertes Methanol
mg	Milligramm
mg/L	Milligramm je Liter
μ g/mL	Mikrogramm je Milliliter
MHz	Megahertz
min	Minute
mL/min	Milliliter je Minute
MM2	Molecular mechanics version 2 (Molekularmechanik, 2. Version)
μ mol	Mikromol, Stoffmengenangabe
mmol/g	Millimol je Gramm
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometer/Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse über Ladung
N ₂	Stickstoff
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NH ₂	Amino
nm	Nanometer
nm/min	Nanometer je Minute
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy (Kernresonanzspektroskopie)
Nr.	Nummer

O ₂	Sauerstoff
<i>p</i>	para
p.a.	pro analysi (analysenrein)
PA	Proanthocyanidin
PAs	Proanthocyanidine
PC	Procyanidin
PCs	Procyanidine
PD	Prodelphinidin
PDA	Photodiodenarray Detektor
PFP	Pentafluorphenyl
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea (Europäisches Arzneibuch)
PI3K/Akt	Phosphatidylinositol-3-kinase / Proteinkinase B
plv.	pulverisiert
Pos.	Position
PP	Propelargonidin, oder bei anderem Zusammenhang Polypropylen
ppm	parts per million (Teile je Million)
psig	Pfund je Quadratinch (1 inch = 2,54 cm) gegenüber Atmosphärendruck
pt	Pseudotriplett
RP	Reversed phase (Umkehrphase)
RPL	Restphenollösung
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
R_F	Relate to front (Verhältnis zur Laufmittelfront)
R_t	Retentionszeit
R_{ts}	Retentionszeiten
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SD	Standardabweichung
Sect.	Section (Sektion)
Sept.	September
t	Triplett (NMR)
t	time (Zeit)
TFA	Trifluoressigsäure
TMS	Tetramethylsilan
TNF α	Tumornekrosefaktor α

Abkürzungsverzeichnis

u.a.	unter anderem
UHPLC	Ultra high performance liquid chromatography (Ultrahochleistungs-Flüssigchromatographie)
UPLC®	Ultra performance liquid chromatography (Ultraleistungs-Flüssigchromatographie)
UV	ultravioletter Bereich (in der Regel im Zusammenhang mit UV-Spektroskopie)
V/V	Volumenanteile
Vanillin/HCl	Vanillin/Salzsäure Sprühreagenz
v.a.	vor allem
var.	Variation
vgl.	vergleiche
VIS	sichtbares Licht
vs.	<i>versus</i>
χ_{cis}	Anteil 2,3- <i>cis</i> konfigurierter Flavan-3-ole in einem Proanthocyanidinmolekül
z.B.	zum Beispiel

2 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit soll die Isolierung von oligomeren PAs und die vergleichende Charakterisierung zweier PA-angereicherter Fraktionen aus *Salix daphnoides* VILL. vorgestellt werden. Außerdem sollte eine Modifizierung der Ph. Eur. Methode 2.8.14 (2.8.14, 2015) zur Abschätzung der Gehalte an Gesamtphenolen und -gerbstoffen in pflanzlichem Material, um einen höheren Probendurchsatz für Screening Projekte zu gewährleisten, entwickelt werden. Diese sollte neben modernen chromatographischen und spektroskopischen Ansätzen (UPLC, MS, NMR) in dem hier beschriebenen Screening Pilotprojekt zu mehreren Weidenindividuen eingesetzt werden.

Die Motivation für die vorliegende Dissertation lag in der pharmazeutischen Relevanz der Weidenrinde als arzneilich genutzte Droge (Weidenrinde, 2015; European Medicines Agency, 2017; E/S/C/O/P monographs, 2003). Hier sind jedoch bis heute große Wissenslücken zu schließen, um die Wirksamkeit und Wirkung entsprechender pharmazeutischer Extrakte zu erklären (Nahrstedt et al., 2007; Schmid et al., 2001b). Da die Salicylalkohole nicht alleine eine positive Bewertung dieser antiinflammatorischen Droge bzgl. ihrer Wirksamkeit erklären können (Schmid et al., 2001a), müssen weitere Inhaltsstoffe dafür mitverantwortlich sein. Dazu könnten auch die PAs, die quantitativ eine Hauptinhaltsstoffgruppe innerhalb der Weiden darstellen, gehören. Die PAs sind insofern eine interessante Inhaltsstoffklasse, als dass sie über eine hohe Bioverfügbarkeit verfügen (Stoupi et al., 2010). Dabei werden diese Verbindungen nicht in ihrer genuinen Form resorbiert, sondern unterliegen einem starken Metabolismus durch die Darmflora (Gonthier et al., 2003). Dabei wäre ein Beitrag zur Wirksamkeit der Extrakte durch die bei der Metabolisierung gebildeten kleinen Moleküle durchaus denkbar. Weiter wurden für PAs löslichkeitsverbessernde Eigenschaften gegenüber anderen phenolischen Verbindungen festgestellt (Butterweck et al., 2003; Jürgenliemk und Nahrstedt, 2003). In den folgenden Kapiteln sollen diese Aspekte detailliert vertieft werden. Dadurch soll auch die Motivation zur Untersuchung der Flavan-3-ole und anderer phenolischer Verbindungen und zum Design der in dieser Arbeit vorgestellten Projekte ersichtlich werden.

2.1 Die pharmazeutische Bedeutung der Weiden und Proanthocyanidine

Die arzneilich verwendete Droge der Weide ist die Rinde (*Salicis cortex*), welche im Ph. Eur. (Weidenrinde, 2015) monographiert ist. Dabei ist interessant, dass sich das Ph. Eur. nicht auf eine einzelne Art festlegt, sondern lediglich einen Mindestgehalt an Salicylalkoholderivaten von 1,5% (berechnet als Salicin) für die jeweils verwendete Droge vorschreibt. Diese Inhaltsstoffklasse wurde auch für lange Zeit für die Wirksamkeit dieser Droge und der daraus gewonnenen Extrakte verantwortlich gemacht. Die Bildung eines wirksamen Metaboliten bestätigte sich *in vivo*. Durch die Abspaltung der Glucose und Esterspaltungen von den Salicylalkoholderivaten wird das Aglykon Saligenin gebildet, welches *in vivo* weiter zur Salicylsäure oxidiert wird (Schmid et al., 2001a). So konnten in pharmakokinetischen Studien Plasmaspiegel von 1,2 mg/L detektiert werden, was einer Äquivalenzdosis von nur ca. 87 mg Acetylsalicylsäure entspricht (Schmid et al., 2001a). Dieses Ergebnis kann somit die Wirksamkeit für die Indikationen kurzfristige Lumbalgie (well-established use: European Medicines Agency, 2017), schwache Gliederschmerzen, Fieber und Kopfschmerzen (traditional use: European Medicines Agency, 2017) nur zum Teil erklären. Die erforderliche antiphlogistische, antipyretische und analgetische Wirksamkeit der Weidenrinde für die Behandlung der genannten Indikationsgebiete (European Medicines Agency, 2017) wurde ebenfalls bereits durch die European Scientific Cooperative On Phytotherapy (E/S/C/O/P) (*Salicis cortex*, 2003) bestätigt. In einer klinischen Studie zur Osteoarthritis konnten von Schmid und Mitarbeitern (2001b) moderate Effekte durch einen Extrakt der Rinde von *Salix purpurea* x *daphnoides* bestätigt werden. Ebenso kamen Chrubasik und Mitarbeiter (Chrubasik et al., 2002; 2000; Chrubasik und Pollak, 2002) zu dem Schluss, dass der Einsatz von Weidenrindenextrakten bei Lumbalgie sinnvoll scheint. Eine Wirkweise vergleichbar der Acetylsalicylsäure scheint jedoch nicht vorzuliegen, da sich deren Wirkmechanismus von denen der Weidenpräparate unterscheidet (Vlachojannis et al., 2011). Auch gilt eine Schädigung der gastrointestinalen Mucosa durch *Salix*-Präparate als unwahrscheinlich (Vlachojannis et al., 2011). Somit müssen weitere Verbindungen, deren aktive Metabolite und/oder synergistische Effekte zur Gesamtwirkung beitragen (Nahrstedt et al., 2007); ein Phänomen, das bei pflanzlichen Vielstoffgemischen bekannt ist (Williamson, 2001).

Neben den Salicylalkoholderivaten gehören auch PAs, monomere Flavan-3-ole und Flavonoide zu den Hauptverbindungsklassen (Meier und Meier-Liebi, 2007). Darüber hinaus wurden in einigen Arbeiten die Phenylpropansäuren untersucht (Nyman und Julkunen-Tiitto, 2005; Paajanen et al., 2011; Poblocka-Olech et al., 2010; Torp et al., 2013). Interessant sind die verschiedenen Wirkungen, die bisher mit Weidenrindenextrakten oder isolierten Verbindungen in zellulären Systemen gezeigt werden konnten. Beispielsweise war es möglich, eine verminderte

Expression des ICAM-1 Proteins an Zelloberflächen durch einen standardisierten Weidenrindenextrakt zu zeigen, was auf Flavonoide und Catechol zurückgeführt werden konnte (Freischmidt et al., 2012). Durch dieses Protein wird die Adhärenz von Neutrophilen an Epithelzellen gewährleistet, wodurch pro-inflammatorische Prozesse begünstigt werden. Catechol konnte auch als Abbauprodukt des Salicortins *in vitro* identifiziert werden (Knuth et al., 2011). Zusätzlich war es auch möglich, in einer pharmakokinetischen Humanstudie Catechol nach Applikation eines Weidenrindenpräparates im Plasma zu detektieren (Knuth et al., 2013). Weiter konnten durch Weidenrindenpräparate *in vitro* signifikante antiinflammatorische Effekte an Lipopolysaccharid-aktivierten Monozyten gezeigt werden. Durch den Extrakt wird neben der Hemmung der intrazellulären Expression von $\text{TNF}\alpha$ auch die Freisetzung von mRNA zur $\text{TNF}\alpha$ - und COX-2-Synthese sowie die Stickstoffmonoxid-Ausschüttung gemindert und die Apoptose pro-inflammatorisch aktivierter Makrophagen induziert (Bonaterra et al., 2010a). Ähnliche Effekte wurden auch an HT-29 Zellen beobachtet und mit Diclofenac verglichen (Bonaterra et al., 2010b). Die Autoren kommen in Übereinstimmung mit anderen Autoren (Corradi et al., 2017) zu dem Schluss, dass synergistische Effekte und der Gesamtextrakt zur Wirksamkeit beitragen müssen. In der Arbeit von Corradi et al. (2017) konnten auch antiproliferative Effekte durch einen Extrakt von *Salix reticulata* L., und Luteolinderivate an HaCaT Zellen demonstriert werden. In einer weiteren *in vitro* Studie mit Kamille (*Matricaria chamomilla* L.), Mädesüß (*Filipendula ulmaria* L.) und Weidenrinde (*Salix alba* L.) stach letztere durch die stärksten Aktivitäten bzgl. der Inhibition der Interleukin-6 und $\text{TNF}\alpha$ -Produktion heraus (Drummond et al., 2013). Neben Polyphenolen machten Gutiérrez et al. (2017) auch noch pentazyklische Triterpene als antiinflammatorische Verbindungsklasse in *Salix canariensis* C. SM. EX LINK durch bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung anhand von Mausmodellen als Teil der Gesamtwirkung sichtbar. Wahid und Mitarbeiter (2016) konnten in einem Rattenmodell hepatoprotektive Effekte eines ethanolischen Extrakts der Blüten von *Salix subserrata* WILLD. demonstrieren. Als Erklärung für diese Beobachtung führten die Autoren antioxidative und antiinflammatorische Effekte auf. Antioxidative Effekte konnten beispielsweise auch für Extrakte von *Salix aegyptiaca* L. (Sonboli et al., 2010) und *Salix mucronata* THUNB. (El-Sayed et al., 2015) festgestellt werden. So kam man in Übersichtsartikeln zu dem Schluss, dass die Wirksamkeit in Bezug auf die Analgesie, Fiebersenkung und inflammatorischen Vorgänge durchaus erklärbar ist und zusätzlich nur wenige unerwünschte Arzneimittelwirkungen befürchtet werden müssen (Chrubasik und Pollak, 2002; Shara und Stohs, 2015). So wird als schwerwiegendste Nebenwirkung eine allergische Reaktion bei Salicylatunverträglichkeit befürchtet und eine Anwendung in der

Schwangerschaft aufgrund ungenügender Datenlage nicht empfohlen (Chrubasik und Pollak, 2002; Shara und Stohs, 2015).

Es gab desweiteren auch Untersuchungen, die über die bisher beschriebenen Indikationsgebiete hinausgehen. So wurden antiproliferative Eigenschaften an Krebszelllinien *in vitro* untersucht, um Rückschlüsse auf mögliche anti-kanzerogene Aktivitäten zu ziehen. So war es Enayat und Mitarbeitern (2013) gelungen, über *in vitro* Studien Indizien für anti-kanzerogene Eigenschaften eines ethanolischen *S. aegyptiaca* Extrakts für Prostata- und Brutkrebszellen zu zeigen. Sie machten dafür eine starke Inhibition der Akt/Protein Kinase B und des MAP Kinase-Signalwegs verantwortlich. Die These, dass Weidenrinde chemopreventive Effekte zeigen könnte, wurde auch durch *in vitro* Resultate zu einem *Salix purpurea* L. Extrakt untermauert (Hostanska et al., 2007). Richtigerweise weisen die Autoren darauf hin, dass derartige Hinweise noch der Verifizierung über *in vivo* Studien bedürfen. Weitere interessante Ergebnisse konnte eine Evaluierung eines standardisierten Weidenrindenextrakts und seiner Fraktionen in Bezug auf neurologische und immunologische Targets liefern (Ulrich-Merzenich et al., 2012). Motiviert war diese Untersuchung durch die Feststellung, dass neurologische und neuropsychiatrische Erkrankungen durch inflammatorische Vorgänge begünstigt sein können (Ulrich-Merzenich et al., 2012). Schließlich kommen die Autoren zu dem Schluss, dass salicylathaltige Phytopharmaka (bzgl. der Weide müsste es korrekterweise salicylalkoholreiche, oder salicylatliefernde Phytopharmaka heißen) eine interessante Komedikation zur Behandlung solcher Krankheitsbilder sein könnte. Weiter wurde die Norepinephrin-induzierte Lipolyse in Fettzellen aus Wistar Ratten *in vitro* mit polyphenolreichen Fraktionen und Flavonoide aus *Salix matsudana* KOIDZ. Blättern genauer untersucht (Han et al., 2003a; Han et al., 2003b). Jedoch fehlen bislang *in vivo* Belege für mögliche fettreduzierenden Eigenschaften von Weidenpräparaten (Shara und Stohs, 2015). Aus derselben Art wurden die Verbindungen Apigenin-7-*O*- β -D-glucopyranuronid, Luteolin-7-*O*- β -D-glucopyranuronid und *m*-Hydroxybenzyl-7- β -D-glucopyranuronid aus den Blättern isoliert und in Bezug auf ihre Wirkung auf den Arachidonsäurestoffwechselweg evaluiert (Zheng et al., 2005). Dabei wurde gezeigt, dass durch diese Substanzen die Bildung der 12-Hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraensäure (12-HETE) und durch das Aglykon Apigenin zusätzlich auch die Synthese des Thromboxan B₂ eingeschränkt wurde. Die Autoren dieser Arbeit sehen daher ein mögliches Einsatzgebiet in der Prävention von Thrombosen und Arteriosklerose.

Für PAs aus verschiedenen Drogen gibt es zahlreiche Untersuchungen bzgl. ihrer pharmakologischen und coeffektorischen Eigenschaften. So wurde durch die Untersuchung des Octanol-H₂O-Koeffizienten des Hypericins in Gegenwart von PC B₂ eine bessere H₂O-

Löslichkeit gezeigt (Jürgenliemk und Nahrstedt, 2003). Bei dieser Studie konnten für Rutin und Hyperosid sogar noch ausgeprägtere Resultate beobachtet werden, wohingegen die Effekte für das Quercetin geringer waren. Diese Ergebnisse konnten für das Hyperosid und PC B₂ auch *in vivo* in Ratten bestätigt werden, da die Bioverfügbarkeit des Hypericins um ca. 34%, respektive 58% erhöht werden konnte (Butterweck et al., 2003). Somit kann eine Erhöhung der H₂O-Löslichkeit lipophiler Verbindungen durch die Anwesenheit von PAs durchaus angenommen werden. Aber auch die Bioverfügbarkeit der PAs selbst ist durchaus beachtlich. So wurde am Beispiel des ¹⁴C radioaktiv markierten PC B₂ eine absolute Bioverfügbarkeit von ca. 82% *in vivo* in einem Rattenmodell registriert (Stoupi et al., 2010). Dabei kamen die Autoren zu dem Schluss, dass es sich dabei nicht um die genuin verabreichte Substanz handelt, sondern um von der Darmflora gebildete Metabolite. Dass die PAs einem starken Metabolismus durch die Darmflora ausgesetzt sind wurde ebenfalls *in vivo* an Ratten untersucht (Gonthier et al., 2003). Dazu wurde PC B₃, PC C₂ und eine Polymerfraktion aus Kätzchen einer Weide isoliert und gegen (+)-Catechin verglichen. In der Folge wurden hauptsächlich kleine phenolische Verbindungen detektiert, die durchaus auch einen Beitrag zur Wirksamkeit eines PA-reichen Extraktes leisten könnten (Gonthier et al., 2003). Allerdings müssten die Metabolite diesbezüglich genauer evaluiert werden. Weiter wurden durch Klongsiriwet und Mitarbeiter (2015) anthelmintische Effekte von Flavonoiden und PAs berichtet. Derartige Effekte durch PAs konnten auch durch Spiegler und Mitarbeiter demonstriert werden (Spiegler et al., 2017; Spiegler et al., 2016). Interessant waren auch Ergebnisse die eine Inhibition der Adhäsion von *Porphyromonas gingivalis* an Epithelzellen zeigten (Oliveira Caleare et al., 2017). Diese Effekte wurden ebenfalls auf Flavan-3-ole und die PAs Samarangenin A und B aus *Limonium brasiliense* BROSS. zurückgeführt, die neben Gallussäure und Epigallocatechin-3-O-gallat die Hauptverbindungen des untersuchten Extrakts darstellten (Oliveira Caleare et al., 2017). Ein weiterer durch eine Fraktion oligomerer 2,3-*trans* konfigurierter PCs aus einer Weidenrinde induzierter Effekt war eine Vasodilatation in Koronararterien des Schweins in einem *ex vivo* Modell (Kaufeld et al., 2014). Die Autoren postulierten dazu eine Aktivierung des PI3K/Akt über den Stickstoffmonoxid/cGMP-Signalweg. Da auch für Acetylsalicylsäure gezeigt werden konnte, dass endotheliale Dysfunktionen verbessert und Stickstoffmonoxidfreisetzung begünstigt wird (Husain et al., 1998; Taubert et al., 2004), postulieren Kaufeld und Mitarbeiter (2014) auch für 2,3-*trans* konfigurierte PCs positive vaskuläre Effekte.

Durch Muema und Mitarbeiter (2016) konnte des Weiteren demonstriert werden, dass die Sterblichkeit von Larven der *Anopheles gambiae* und *A. arabiensis* (sensu stricto) nach PA-

Applikation erhöht werden konnte. Beide Arten spielen in der Verbreitung der Malaria in Afrika eine maßgebliche Rolle (Muema et al., 2016).

2.2 Die ökologische Bedeutung der Weiden und Proanthocyanidine

Im Folgenden soll die ökologische Bedeutung der Weiden herausgearbeitet werden. Bei *Salix* handelt es sich um eine nahezu weltweit in verschiedenen Ökosystemen vorkommende Gattung. Beispielsweise kann *Salix herbacea* L. auf Meereshöhe bis hin in den alpinen Bereich gefunden werden (Holdenrieder et al., 1999). Andere Arten sind dagegen auf engere Höhenbereiche beschränkt, wie etwa *Salix fragilis* L., die lediglich bis ca. 800 m über dem Meeresspiegel vorkommt (Holdenrieder et al., 1999; Oberdorfer, 2001). Im Falle der *Salix purpurea* L. handelt es sich um eine Pionierstrauchart mit sehr ausgeprägter Vertikalverteilung (Schütt und Lang, 2014). So kann diese in ganz Mittel- und Südeuropa und in großen Teilen Asiens bis nach China gefunden werden (Holdenrieder et al., 1999; Schütt und Lang, 2014). Andere Arten, wie *Salix caesia* VILL., *Salix bicolor* WILLD. oder *Salix helvetica* VILL., zeichnen sich durch eine Beschränkung auf kleinflächige Gebirgsregionen und eine höhere Spezialisierung auf diese Ökosysteme aus (Holdenrieder et al., 1999). Der besondere ökologische Erfolg der Weiden kann auf besondere Frostresistenz, hohe Toleranz gegen Überflutungen und schnelle Regeneration nach Verletzungen zurückgeführt werden (Holdenrieder et al., 1999). Weiden sind nicht als Bestandteil mitteleuropäischer Klimaxwälder zu finden. Ihr übliches Habitat sind Auengewässer sowie Schotter-, Kies- und Schlickbänke, wo andere Baumarten nicht zur Besiedelung fähig sind (Holdenrieder et al., 1999). Weiter handelt es sich dabei um sehr schnellwüchsige, aber meist auch kurzlebige Arten (Holdenrieder et al., 1999).

Weiden stellen aber auch für viele weitere Organismen eine wichtige Lebensgrundlage dar. So können diese als „Ökosystem-Ingenieure“ bezeichnet werden (Holdenrieder et al., 1999). Dieser Begriff wurde von Jones et al. (1994) für Organismen definiert, die auf direkte oder indirekte Weise die Verfügbarkeit von Ressourcen für andere Arten modulieren. Weiden können über Wind, Insekten oder auch über eine Kombination dieser beiden Strategien bestäubt werden (Totland und Sottocornola, 2001). So wurde beispielsweise die Zusammensetzung der Blütenduftstoffe im Hinblick auf die Bestäubung durch Bienen in mehreren Spezies (Füssel et al., 2007) und in den Geschlechtern der *Salix caprea* L. zusammen mit anderen relevanten Parametern (Dötterl et al., 2014) untersucht. Ebenso beleuchteten Vanderplanck und Mitarbeiter (2014) neben anderen Taxa auch die Interaktion zwischen Bienen als Bestäuber und *S. caprea*. Kopelke und Mitarbeiter (2017) erarbeiteten außerdem einen Datensatz bzgl. der Interaktion

zwischen *Salix* Spezies, gallebildenden Sägewespen und deren natürlichen „Feinden“. Ein weiteres Projekt erarbeitete die Funktion der Phenole in hybridisierten Weiden als Abwehrmechanismus gegen einen herbivoren Weidenblattkäfer (*Phratora vulgatissima* L., Torp et al., 2013). Jedoch sind Weiden auch für Säugetiere durchaus von Bedeutung und co-evolutionäre Effekte beobachtet werden. So konnte z.B. die Funktion der Phenole in Weiden als Fraßschutz gegen Schneehasen beleuchtet werden (Tahvanainen et al., 1985).

Besonders interessant sind die Ergebnisse von Untersuchungen bzgl. der ökologischen Rolle der PAs. So konnte deren Funktion zur Abwehr von Herbivoren an einigen Beispielen gezeigt werden (Ayres et al., 1997; Clausen et al., 1990; Feeny, 1968; Haukioja, 2003). Dabei sind vor allem die Ergebnisse von Clausen et al. (1990) beachtenswert, wo PAs mit unterschiedlicher Stereochemie aus *Purshia tridentata* PURSH. und *Colegyne ramosissima* TORR. von Schneeschuhhasen unterschiedlich stark bevorzugt wurden. Diese Beobachtungen, dass PAs von Pflanzen zur Abwehr von Herbivoren genutzt werden, konnten auch auf enzymatischer Ebene untermauert werden, indem durch herbivoren Stress eine Hochregulierung der Dihydroflavonolreduktase induziert wurde (Peters und Constabel, 2002). Dieses Protein stellt ein Schlüsselenzym in der PA-Biosynthese dar, da dadurch die entsprechende Kettenverlängerung in diesen polymerisierten Molekülen ermöglicht wird (Winkel-Shirley, 2001). Auch der Pilz *Ceratomyces polonica* verursachte eine verstärkte Expression der PAs in Fichten (Hammerbacher et al., 2014). Boeckler et al. (2014) zeigten für die Schmetterlingsarten *Malacosoma disstria* und *Lymantria dispar* dass diese vor allem *Populus tremula* x *tremuloides* (Salicaceae) als Nahrungsquelle bevorzugten. Dabei stellten die Autoren fest, dass bei diesem Hybrid das gerbstoffregulierende MYB134-Gen überexprimiert ist. Durch zahlreiche Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine derartige Überexpression in hohen PA-Gehalte resultiert (Baudry et al., 2004; Mellway et al., 2009; Nesi et al., 2001; Sharma und Dixon, 2005). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Funktion der PAs über die Abwehr von Herbivoren hinausgeht. Aufgrund der vielfältigen beschriebenen Interaktionen im Zusammenhang mit PAs kann es durchaus als wahrscheinlich angesehen werden, dass Pflanzen einen gewissen evolutionären Vorteil haben, wenn sie in der Lage sind ein gewisses Set dieser Klasse in ausreichender Menge zu synthetisieren. Weiter konnten Veränderungen in den Konzentrationen von PAs als Reaktion auf Veränderungen biotischer und abiotischer Faktoren beobachtet werden. So konnte ein Einfluss des Stickstoffgehalts im Boden auf die Biosyntheseleistung bzgl. der PAs in *Populus tremula* L. registriert werden (Decker et al., 2016). Durch Scioneaux et al. (2011) wurde ebenfalls eine starke genetische Disposition der PA-Biosynthese in der Gattung *Populus* gezeigt. Eine beson-

dere Motivation für die Untersuchung des PA-Metaboloms ist vor allem durch Arbeiten begründet, die zeigten, dass Hybridisierung einen deutlichen Einfluss auf die PA-Biosynthese von Weiden hat (Hallgren et al., 2003; Orians et al., 2000; Orians und Fritz, 1995).

Ebenfalls wurden mögliche Auswirkungen durch den Klimawandel am Modell der *Salix myrsinifolia* SALISB. untersucht (Nybakken und Julkunen-Tiitto, 2013; Paajanen et al., 2011; Tegelberg und Julkunen-Tiitto, 2001). Hierbei kamen Paajanen und Mitarbeiter (2011) zu dem Ergebnis, dass erhöhte Kohlendioxidwerte, Temperatur und UV-B-Strahlung keine einschneidenden Folgen für diese Art hatten.

2.3 Die phenolischen Hauptinhaltsstoffgruppen in Weiden

Im Folgenden sollen die phenolischen Hauptinhaltsstoffgruppen der Weiden vorgestellt werden, die für die vorliegende Arbeit relevant sind. Dabei sollen exemplarische Strukturbeispiele zur Veranschaulichung dienen.

Die Salicylalkoholderivate stellen die wohl am besten untersuchte phenolische Inhaltsstoffklasse in *Salix* Spezies dar. Dies ist sicherlich auf deren pharmazeutische Bedeutung zurückzuführen (vgl. Kapitel 2.1). In **Abb. 2-1** sind die Strukturen der Verbindungen Salicortin und Tremulacin, deren Strukturen von Pearl und Darling (1971) aufgeklärt wurden, das 2'-*O*-Acetylsalicortin (Egloff, 1982), das 2'-*O*-Acetylsalicin (Shao, 1991) und das Salicin (Thieme, 1963) abgebildet. Diese Stoffklasse kann in der Droge *Salicis cortex* einen Gehalt von bis zu 10% aufweisen (Meier und Meier-Liebi, 2007). Dabei kommt das Salicin genuin nur bis zu 1% in entsprechendem Material vor (Meier und Meier-Liebi, 2007). Von Thieme (1963) wurde die Struktur des Fragilins (6'-*O*-Acetylsalicin) in einer Übersichtsarbeit vorgestellt. Jedoch ergaben neuere Resultate von Shao (1991), dass die Acetylierung an Position 6' revidiert werden muss. Damit dürfte es sich auch bei der von Thieme vorgestellten Verbindung tatsächlich um das 2'-*O*-Acetylsalicin gehandelt haben (Meier und Meier-Liebi, 2007).

Eine weitere Hauptinhaltsstoffgruppe sind die Flavan-3-ole. Dazu sind einige Strukturbeispiele in **Abb. 2-2** dargestellt. Zu dieser Inhaltsstoffgruppe gehören monomere Verbindungen, wie das (+)-Catechin oder das (-)-Epicatechin. Beide Verbindungen wurden bereits aus Weiden isoliert (Hsu et al., 1985; Kolodziej, 1990; Pearl und Darling, 1970). Daneben gibt es aber auch polymerisierte Vertreter dieser Klasse, die sogenannten Proanthocyanidine, die auch als kondensierte Gerbstoffe bezeichnet werden. Die Bezeichnung Proanthocyanidine leitet sich von den Reaktionsprodukten nach einer oxidativen Spaltung im Sauren ab. Dabei entstehen die deutlich gefärbten Anthocyanidine (vgl. Reaktionsgleichung: **Abb. 4-14** in Kapitel 4.5.6).

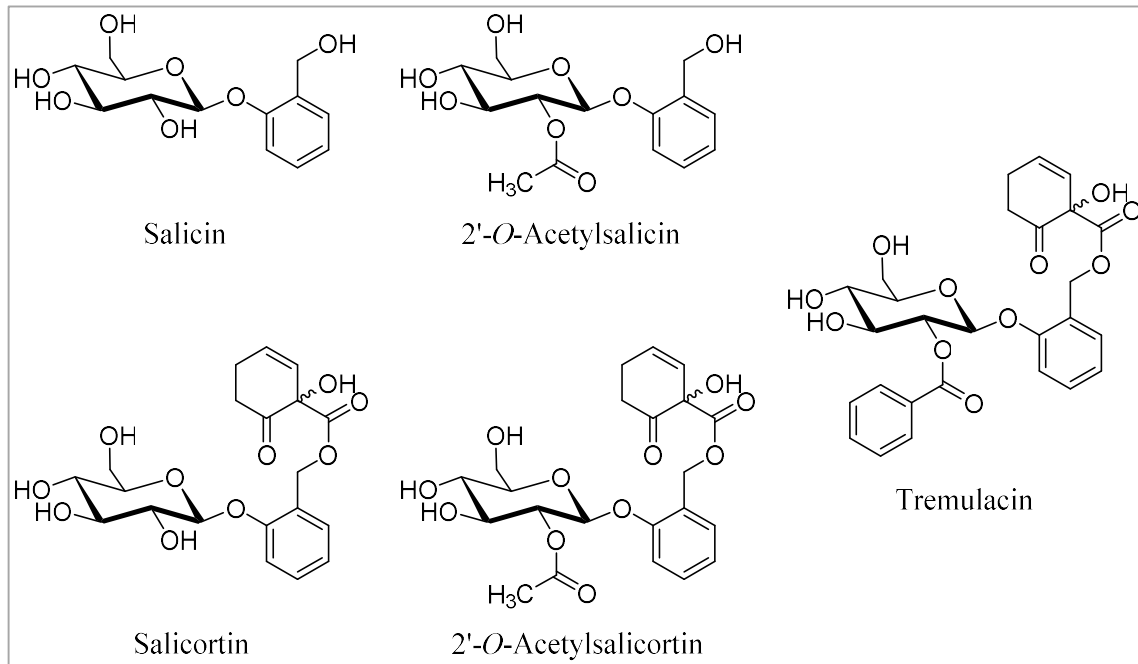


Abb. 2-1: Beispiele für Salicylalkoholderivate aus *Salix* Spezies.

Je nach Substitutionsmuster des freigesetzten Anthocyanidins können hier genauere Untergruppen definiert werden. So bezeichnet man das PC B1 (**Abb. 2-2**) als Procyanidin, da bei einer derartigen Reaktion die obere Einheit zum Cyanidin oxidiert wird. Weitere oligomere Proanthocyanidine, wie das PC B1, wurden bereits häufiger aus Weiden isoliert (z.B.: Thompson et al., 1972; Kolodziej, 1990; Hsu et al., 1985; Jürgenliemk et al., 2007). Bei der Verbindung Gallocatechin-(4 α →8)-catechin, das von Foo und Porter (1978) aus *Salix caprea* L. isoliert wurde, wird hingegen bei dieser Reaktion aus der oberen Einheit ein Delphinidin freigesetzt. Damit kann man PAs mit dieser Eigenschaft als Prodelphinidine deklarieren. So würde aus oberen Afzelecheneinheiten (ein monohydroxyliertes Flavan-3-ol) bei dieser Analytik das Pelargonidin entstehen. Daher werden solche kondensierten Gerbstoffe auch als Propelargonidine bezeichnet. Dieses Reaktionsprinzip nutzten bereits Binns und Mitarbeiter (Binns et al., 1968; Binns und Blunden, 1969) indem diese die freigesetzten Anthocyanidine aus *Salix* Spezies photometrisch quantifizierten. Jedoch führten sie dieses Experiment in der Absicht durch, den jeweiligen Gehalt an Leukoanthocyanidinen (Flavan-3,4-diole) zu bestimmen. Dabei dürften jedoch hauptsächlich PAs erfasst worden sein. In **Abb. 2-2** ist auch ein polymeres 4→8 verknüpftes PA gezeigt. Dazu sollte noch ergänzt werden, dass in dieser Strukturklasse von dimeren bis polymeren PAs auch 4→6 Verknüpfungen in Strukturen vorkommen können, wie z.B. bei PC B5. Da neben diesem Gerbstofftyp wohl keine hydrolyisierbaren Gerbstoffe, bzw. Gallotannine,

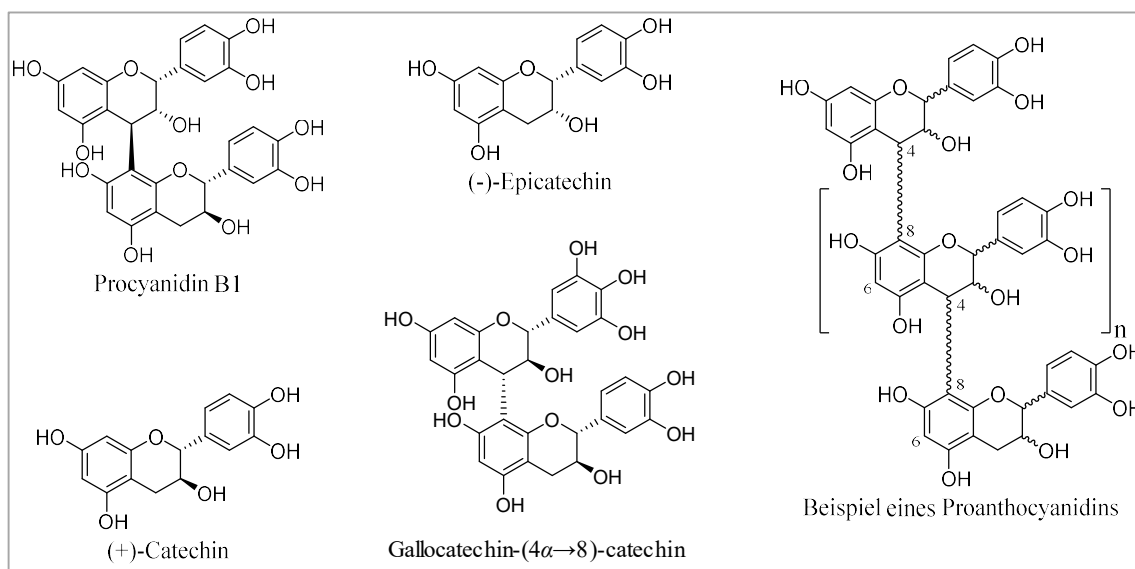


Abb. 2-2: Strukturbeispiele für Flavan-3-ole, die in Weiden vorkommen.

in Weiden vorkommen sollten (Meier und Meier-Liebi, 2007), kann davon ausgegangen werden, dass bei der Quantifizierung der Gerbstoffe mit einer gravimetrischen Hautpulvermethode in mehreren Weidenrinden durch Thieme (1968) hauptsächlich die PAs quantifiziert wurden. Dieser stellte Konzentrationen zwischen 8,7% und 20,5% in den untersuchten Spezies fest. Durch einen colorimetrischen Vanillin-HCl-Assay wurde durch Julkunen-Tiitto (1989a) ein Flavan-3-ol-Gehalt von 3% - 20% in den Rinden und 1% - 16% in den Blättern von Weiden gemessen. Damit dürfte es sich auch hier um eine Hauptinhaltsstoffklasse der Vertreter der Gattung *Salix* handeln.

Da die Flavan-3-ole in maßgeblichen Mengen in diesen Spezies vorkommen, wurden diese separat von anderen Flavonoiden behandelt, die sich ebenfalls in *Salix* Arten auffinden lassen. Dazu sind einige Strukturbeispiele in **Abb. 2-3** aufgeführt. Shao (1991) sowie Meier und Meier-Liebi (2007) liefern bzgl. dieser Substanzen einen Überblick. So wurden z.B. Chalkone, wie Isosalipurposid, Flavanone, wie Naringenin und dessen Derivate, und Flavonole, wie das Taxifolin, z.B. in der Rinde von *S. purpurea* (z.B. Freischmidt, 2011) gefunden und isoliert. Vertreter der beiden letztgenannten Klassen wurden auch aus dem Holz von *S. caprea* (Malterud et al., 1985) gewonnen. Weiter können in den Blättern auch Flavone, wie Apigenin und Luteolin, und Flavonole, wie Quercetin und Isorhamnetin, gefunden werden (Meier und Meier-Liebi, 2007). Eine weitere phenolische Stoffgruppe, die Erwähnung finden soll sind die Phenylpropane. Dabei handelt es sich im Falle der Weiden in der Regel um *p*-Cumarsäure, Kaffeesäure und deren Derivate (**Abb. 2-4**). So wurden neben anderen Vertretern die Chlorogensäure und die *p*-Cumarsäure in den Blättern mehrerer *Salix* Spezies gefunden (Julkunen-Tiitto und

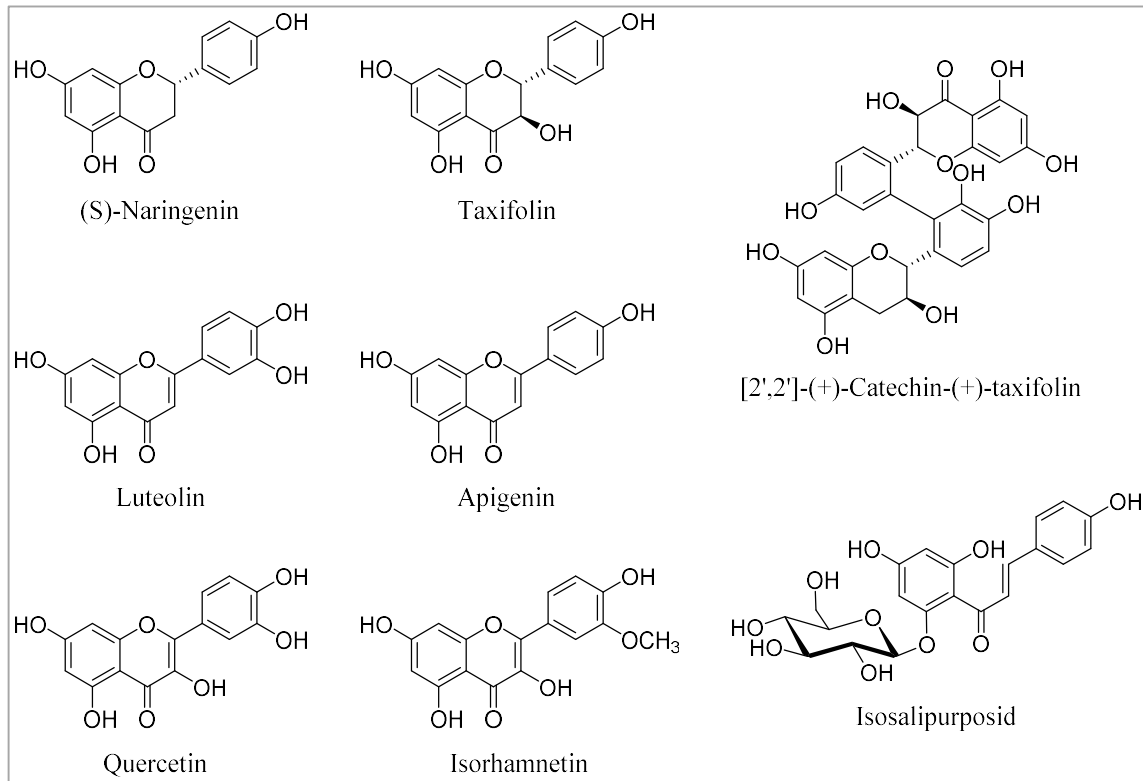


Abb. 2-3: Beispiele von in Weiden verifizierten Flavonoiden.

Meier, 1992; Nyman und Julkunen-Tiitto, 2005; Poblocka-Olech et al., 2010; Torp et al., 2013). Letztere konnte auch zusammen mit der Kaffeesäure und Ferulasäure in den Rinden einiger Weidenarten detektiert werden (Poblocka-Olech et al., 2010). Hochinteressant waren außerdem Befunde, bei denen Naringeninglucoside (6'-*O-trans-p*-Cumaroyl-(2*R*/2*S*)-naringenin-5-*O*- β -D-glucosid) aus *S. purpurea* (Freischmidt et al., 2012; Freischmidt, 2011) und Isosalipurposid (6'-*O-trans-p*-Cumaroylisosalipurposid) aus *S. purpurea* und *S. acutifolia* (Freischmidt et al., 2012; Freischmidt, 2011; Zapesochaya et al., 2002) mit *p*-Cumarsäureresten substituiert waren.

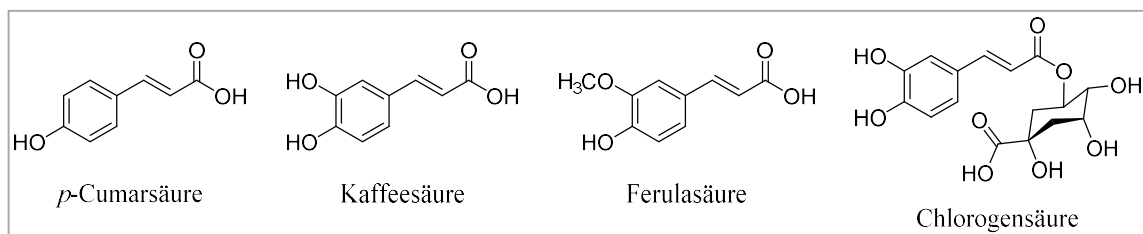


Abb. 2-4: Strukturbeispiele bereits für Weiden beschriebener Phenylpropansäuren.

2.4 Vorstellung der für diese Arbeit relevanten *Salix* Spezies

Bei *Salix* L. (Weiden) handelt es sich um eine Gattung der Familie Salicaceae. Die Diversität innerhalb dieses Genus ist sehr groß. So schätzt man den Artenumfang auf ca. 500 Spezies mit einer nahezu weltweiten Ausbreitung, vor allem in der Nordhemisphäre (Aas, 2016; Lauron-Moreau et al., 2015; Wu et al., 2015). In Deutschland sind 37 Arten heimisch (Aas, 2016). Weiden sind in der Regel zweihäusig (Schmeil und Fitschen, 2016) und sommergrün (Aas, 2016), jedoch gibt es auch Ausnahmen wie *Salix x sepulcris* SIMONK., welche in ihren Blütenständen Blüten beider Geschlechter beherbergt (Aas, 2016). Bei den Blütenständen handelt es sich um Ähren, die bei den Weiden gemeinhin als Kätzchen bezeichnet werden (Schmeil und Fitschen, 2016). Aufgrund des immensen Artenreichtums wurde durch Skvortsov und Zinovjev (1999) eine weitere systematische Untergliederung in drei Subgenera und 26 Sektionen vorgestellt (vgl. **Abb. 2-5**). Allerdings basiert diese Einteilung nur auf morphologischen Merkmalen der jeweiligen Arten. Aufgrund seiner Ähnlichkeiten zur Gattung *Populus* L. (Pappeln, Salicaceae) wird der Subgenus *Salix* als ursprüngliche Wurzel am Beginn der Entwicklung der Weiden angesehen (Skvortsov und Zinovjev, 1999). Die Autoren (Skvortsov und Zinovjev, 1999) gaben an, dass an der Zugehörigkeit der Sektionen innerhalb der Subgattung *Salix* kein Zweifel besteht. Jedoch kam man durch genetische Untersuchungen zu dem Schluss, dass beispielsweise *Salix triandra* L. (Lauron-Moreau et al., 2015; Trybush et al., 2008) und *Salix maccalliana* ROWLEE (Lauron-Moreau et al., 2015) vermutlich nicht zu diesem Subgenus gehören dürften. Auf Basis weiterer genetischer Untersuchungen bzgl. dieser Subgattung kamen Wu und Mitarbeiter (2015) zu dem Schluss, dass die Sektionen *Triandrae* (von Skvortsov und Zinovjev (1999) nicht einzeln berücksichtigt) und *Urbanianae* und einige einzelne Arten exkludiert werden sollten.

All diese Informationen motivieren zur Untersuchung chemotaxonomischer Zusammenhänge. Im Folgenden sollen die in dieser Studie eingeschlossenen *Salix* Spezies kurz vorgestellt werden.

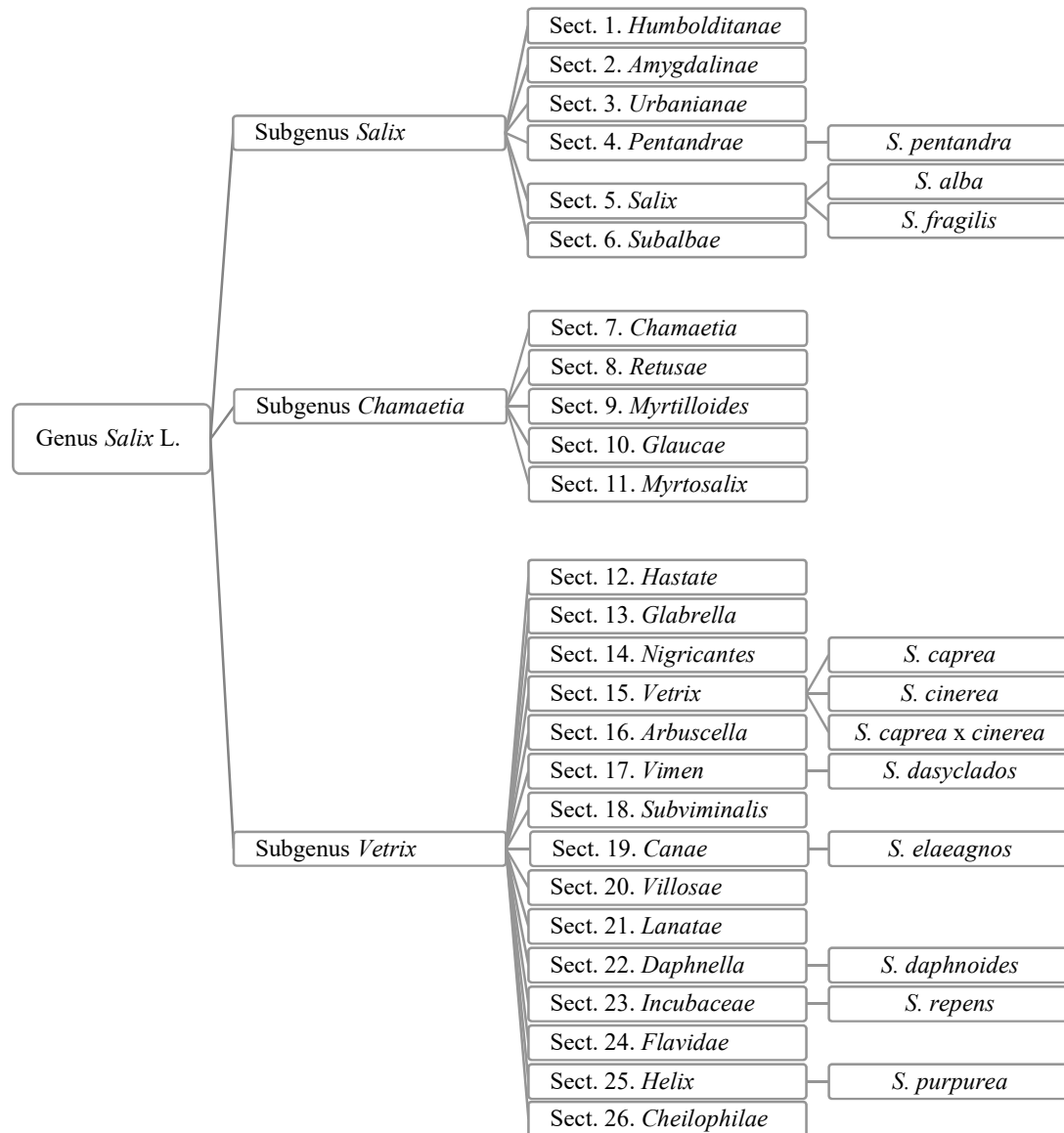


Abb. 2-5: Einteilung des Genus *Salix* L., ohne Berücksichtigung der amerikanischen Sektion *Longifoliae* in Subgattungen und Sektionen (Sect.) nach Skvortsov und Zinovjev (1999). Zusätzlich wurden die für die vorliegende Arbeit relevanten Weiden in diese Systematik eingearbeitet.

2.4.1 *Salix pentandra* L.



Abb. 2-6: Habitus (links) und Vorder- und Rückseite eines Blattes (rechts) von *Salix pentandra* L. Die Bilder wurden im Ökologisch-Botanischen Garten der Universität Bayreuth (Deutschland) aufgenommen.

Bei *Salix pentandra* L. (Lorbeer-Weide) handelt es sich um Sträucher oder bis zu 15 m hohe Bäume (vgl. **Abb. 2-6**, links). Sie zeigen eine kahle Sprossachse. Die Blätter zeichnen sich durch eine ovale oder schmal ovale Spreite mit einer Länge von 5 – 12 cm und einer Breite von 1,5 – 4 cm aus (vgl. **Abb. 2-6**, rechts). Die Nebenblätter sind eiförmig, wenig deutlich ausgeprägt oder gar fehlend. Der Rand der Blätter ist dicht drüsig und gesägt. Die Oberseite der Blätter ist intensiv glänzend dunkelgrün, während die Unterseite ein helleres grün zeigt. Die Blütezeit erstreckt sich mit oder nach dem Laubaustrieb von Mai bis Juni. Der Stiel der länglichen Kätzchen (♂: 3 – 5 cm; ♀: 2 – 4 cm) ist 2 – 5 cm lang mit gut entwickelten Laublättchen. Die ♂ Blüten beinhalten in der Regel drei bis acht, meist jedoch fünf, Staubblätter mit im unteren Teil behaarten Staubfäden. Die ♀ Blüten haben kurz gestielte kahle Fruchtknoten. Dabei besitzen die Griffel etwa $\frac{1}{4}$ der Länge der Fruchtknoten. Die Tragblätter der Blüten sind einfarbig hell, im unteren Teil mehr oder weniger behaart und an der Spitze kahl. Die Fruchtkätzchen sind hängend und oft bis weit in den Herbst vorhanden (vgl. **Abb. 2-7**). Das Ausbreitungsgebiet erstreckt sich über Europa, Kleinasien, den Kaukasus und Sibirien. Diese Art ist in feuchten Wäldern, Auenlandschaften an Flussufern, Mooren und als Zierpflanze in Gärten vorzufinden (Aas, 2016; Schmeil und Fitschen, 2016).

Nach der systematischen Klassifizierung nach Skvortsov und Zinovjev (1999) wird diese Art zum Subgenus *Salix* und der 4. Sektion *Pentandrae* gerechnet.



Abb. 2-7: Die hängenden Fruchtkätzchen einer *Salix pentandra* L. aufgenommen im Ökologisch-Botanischen Garten der Universität Bayreuth (Deutschland).

S. pentandra war auch Gegenstand zahlreicher Studien. So wurde diese Art in Untersuchungen der Gerbstofffraktion, Leukoanthocyanidine und Salicylalkoholderivaten mit einbezogen (Binns et al., 1968; Egloff, 1982; Förster et al., 2010; Förster et al., 2008; Julkunen-Tiitto, 1989b, 1986, 1985a; Lindroth und Pajutee, 1987; Meier et al., 1988; Ruuhola und Julkunen-Tiitto, 2003; Tahvanainen et al., 1985; Thieme, 1968, 1965d, 1965b). Dabei wurden in Bezug auf die Salicylalkohole bereits Jahresverläufe der Konzentrationen in der Rinde (Förster et al., 2010; Förster et al., 2008) und in den Blättern (Thieme, 1965c) untersucht. Weiter war diese Art auch Gegenstand ökologischer Betrachtungen (Tahvanainen et al., 1985).

2.4.2 *Salix fragilis* L.

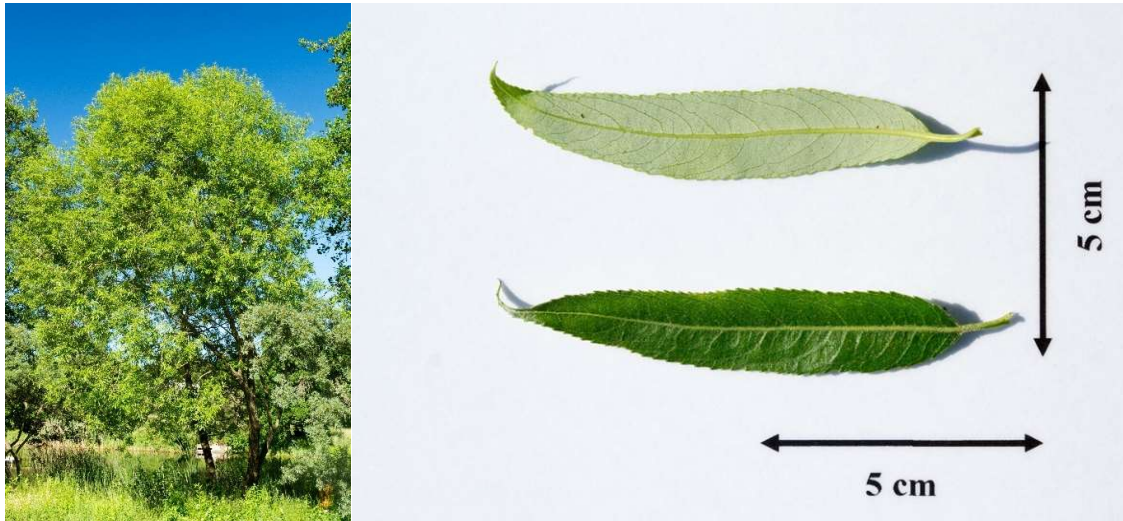


Abb. 2-8: Habitus (links) und Vorder- und Rückseite eines Blattes (rechts) von *Salix fragilis* L. Die Bilder wurden im Ökologisch-Botanischen Garten der Universität Bayreuth (Deutschland) aufgenommen.

Bei *Salix fragilis* L. (Bruch-Weide, Knack-Weide) handelt es sich um Bäume mit einer Wuchshöhe von bis zu 25 m (vgl. **Abb. 2-8**, links). Die Sprossachse und Knospen sind kahl. Die meist gelbbraunen Zweige brechen an ihrer Tragachse leicht ab, was die Bezeichnung als Bruch-Weide erklären dürfte. An kräftigen Trieben sind breit eiförmige Nebenblätter meist deutlich zu erkennen, während diese sonst undeutlich ausgeprägt sind oder gar fehlen. Die Blätter zeichnen sich durch eine lanzettliche Spreite mit einer Länge von 8 - 18 cm und einer Breite von 2 - 4 cm aus. Dabei ist die maximale Breite meist unterhalb der Blattmitte zu finden. Die Blätter sind kahl und höchstens ganz jung etwas behaart. Weiter sind sie vorne lang zugespitzt, am Rand drüsig und gesägt, zeigen überwiegend glänzend grüne Oberseiten und hellere, meist grauweiße, Unterseiten (vgl. **Abb. 2-8**, rechts). Die Blütezeit erstreckt sich von April bis Mai mit dem Laubaustrieb. Die Kätzchen verfügen meist über 1,5 - 3 cm lange Stiele und sind vor dem Aufblühen mit dem weißen Haarfilz der Deckblätter eingehüllt. Die Fruchtknoten der ♀ Blüten sind kurz gestielt, kahl und haben kurze Griffel. Die ♂ Blüten zeichnen sich durch zwei Staubfäden aus, welche im unteren Teil behaart sind. Die Tragblätter der Blüten sind einfarbig gelbgrün und bis zur Spitze weiß behaart. Das Ausbreitungsgebiet erstreckt sich über Europa, Südwest- und Westasien, wo diese Spezies überwiegend in Fluss- und Bachauen des Hügel- und Berglandes zu finden ist (Aas, 2016; Schmeil und Fitschen, 2016).

In der systematischen Einteilung nach Skvortsov und Zinovjev (1999) ist diese Art innerhalb des Subgenus *Salix* und in der 5. Sektion *Salix* zu finden.

In wissenschaftlichen Untersuchungen waren die phenolischen Inhaltsstoffe (z.B.: Salicylalkoholderivate, PAs, Leukoanthocyanidine) Gegenstand zahlreicher Projekte (Binns et al., 1968; Egloff, 1982; Julkunen-Tiitto, 1989b, 1986; Meier et al., 1985b; Oberprieler et al., 2013; Poblacka-Olech und Krauze-Baranowska, 2008; Thieme, 1968, 1965d, 1965b, 1965c, 1964a). Dabei wurden beispielweise Einflüsse verschiedener Trocknungsarten des Pflanzenmaterials bzgl. der Stabilität der phenolischen Sekundärmetabolite anhand dieser Art untersucht (Julkunen-Tiitto und Gebhardt, 1992). Weiter gab es zusammen mit *Salix alba* L. eine Studie bzgl. der taxonomischen Integrität des Bastards *Salix x rubens* SCHRANK (*Salix alba* x *fragilis*) zu seinen Eltern unter der Berücksichtigung molekularer und phytochemischer Aspekte (Oberprieler et al., 2013). Interessant waren auch die Untersuchungen der tageszeitlichen Schwankungen der Salicylalkohole in den Blättern und der Rinde dieser Art (Thieme, 1965c).

2.4.3 *Salix alba* L.



Abb. 2-9: Habitus (links) und Vorder- und Rückseite eines Blattes (rechts) von *Salix alba* var. *britzensis* SPAETH. Die Bilder wurden im Ökologisch-Botanischen Garten der Universität Bayreuth (Deutschland) aufgenommen.

Bei *Salix alba* L. (Silber-Weide) handelt es sich um bis zu 35 m hohe Bäume (vgl. **Abb. 2-9**, links). Die Sprossachse und Knospen sind anliegend behaart, verkahlend und die älteren Triebe kahl. Die Nebenblätter sind klein und länglich, fehlen jedoch meist. Die Blattspreite ist lanzettlich mit einer Länge von 5 - 12 cm und einer Breite von 1 - 2 cm. Die größte Breite der Blätter befindet sich dabei ungefähr in der Mitte. Die Blattränder sind fein drüsig gesägt. Die Blattunterseiten sind vor allem anfangs dicht anliegend silbrig-seidig behaart, während die Oberseite zu Beginn behaart ist, verkahlt jedoch im Laufe der Zeit und zeigt schließlich meist eine dunkelgrüne Farbe (vgl. **Abb. 2-9**, rechts). Die Blütezeit erstreckt sich zwischen April und Mai zusammen mit dem Laubaustrieb. Die Kätzchenstiele sind meist 0,5 - 2 cm lang und weißlich behaart mit gut entwickelten Laubblättchen. Die länglichen Kätzchen sind ca. 3 - 7 cm lang. Die Fruchtknoten der ♀ Blüten sind sitzend und kahl und die Griffel sind kurz. Die ♂ Blüten beinhalten zwei im unteren Teil behaarte Staubfäden. Die Tragblätter der Blüten sind einfarbig gelbgrün und meist nur im unteren Teil behaart. Das Ausbreitungsgebiet erstreckt sich über Europa, Nordafrika, Südwest- und Westasien bis hin zum Himalaja und Tibet. Diese Spezies ist an Ufern von Fluss- und Bachauen und Weichholz-Auwäldern vor allem im Tief- und Hügelland zu finden (Aas, 2016; Schmeil und Fitschen, 2016).

Innerhalb dieser Art können drei Variationen gefunden werden. Neben der typischen *S. alba* var. *alba* treten weiter *Salix alba* var. *vitellina* (L.) STOKES (Dotter-Weide, bunte Weide) und *Salix alba* var. *britzensis* SPAETH (Mennige-Weide, Kermesin-Weide, vgl. Abb. 2-5) auf. Die erstgenannte Variation grenzt sich durch hellgelbe einjährige Zweige und durch oberseitig

meist kahle und auf der Unterseite spärlich behaarte Blattspreiten ab. Zweitgenannte Variation ist durch die vor allem im Winter zinnoberroten einjährigen Zweige zu differenzieren (Aas, 2016).

In der systematischen Einteilung nach Skvortsov und Zinovjev (1999) ist diese Art, wie *S. fragilis*, innerhalb des Subgenus *Salix* und in der 5. Sektion *Salix* zu finden.

Die phenolischen Verbindungen wurden in zahlreichen Projekten untersucht (Behrens et al., 2003; Binns et al., 1968; Egloff, 1982; Esatbeyoglu et al., 2010; Julkunen-Tiitto, 1989b, 1986; Lindroth und Pajutee, 1987; Meier et al., 1985b; Oberprieler et al., 2013; Poblocka-Olech et al., 2010; Poblocka-Olech und Krauze-Baranowska, 2008; Poblocka-Olech et al., 2007; Thieme, 1968, 1965d, 1965b). Wie bereits bei *S. fragilis* vorgestellt (vgl. Kapitel 2.4.2) untersuchten Oberprieler und Mitarbeiter (2013) die taxonomischen Zusammenhänge zwischen *S. x rubens* und seinen Eltern *S. fragilis* und *S. alba* untersucht. Besondere Berücksichtigung erfuhren die PCs in den Studien von Esatbeyoglu et al. (2010) und Poblocka-Olech, Krauze-Baranowska (2008) und Behrens et al. (2003). Jedoch wurden anhand dieser Spezies auch pharmazeutische Aspekte wie die Inhibition proinflammatorischer Biomarker in Makrophagen (Drummond et al., 2013) und die Bioverfügbarkeit derer Inhaltsstoffe (Gawlik-Dziki et al., 2014) untersucht. Weiter wurde die Wirksamkeit und Sicherheit eines *Salicis albae cortex* Extrakts bewertet (Shara und Stohs, 2015).

2.4.4 *Salix caprea* L.

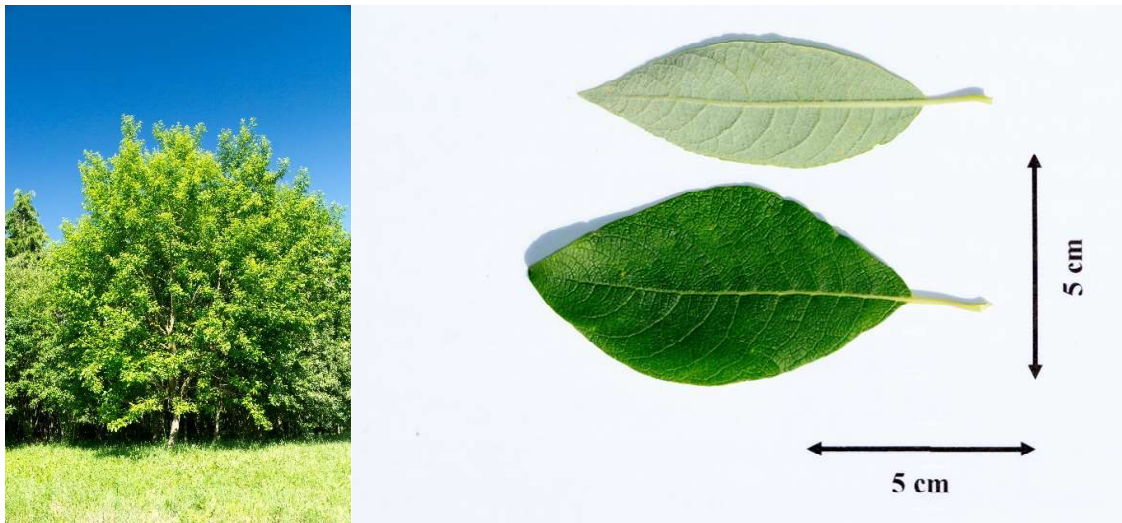


Abb. 2-10: Habitus (links) und Vorder- und Rückseite eines Blattes (rechts) von *Salix caprea* L. Die Bilder wurden im Ökologisch-Botanischen Garten der Universität Bayreuth (Deutschland) aufgenommen.

Bei *Salix caprea* L. (Sal-Weide) handelt es sich um einen bis zu 12 m hohen Baum, oder großen Strauch (vgl. **Abb. 2-10**, links). Die Rinde weist an Stämmen und dickeren Ästen deutliche, rautenförmige Korkwarzen auf. Das entrindete Holz von zwei- bis vierjährigen Trieben zeigt keine Striemen und das Mark der Zweige ist braun gefärbt. Die junge Sprossachse ist zu Beginn dicht behaart und verkahlt anschließend. So sind die einjährigen Sprossachsen meist kahl. Die rundlichen Nebenblätter sind nur an kräftigen Trieben deutlich ausgeprägt, ansonsten undeutlich oder fehlend. Die Blätter zeigen eine ovale Spreite mit kurzer, meist etwas verdrehter Spitze. Die Blätter sind meist 5 - 10 cm, teilweise sogar bis zu 15 cm, lang und 2,5 - 4 cm, in Teilen auch bis 7 cm breit. Dabei entspricht die Länge in der Regel der höchstens 2,5-fachen Breite. Außerdem sind die Blätter am Rand wellig, undeutlich oder unregelmäßig gekerbt oder ganzrandig. Die Oberseite ist anfangs etwas behaart, dunkelgrün, schwach glänzend und später kahl. Die Unterseite ist graugrün, dicht bis locker weißfilzig und selten gänzlich verkahlend. Die weitmaschige Nervatur tritt deutlich auf der Unterseite hervor, auf der Oberseite ist diese etwas vertieft (vgl. **Abb. 2-10**, rechts). Die Blütezeit erstreckt sich von März bis April bereits vor dem Laubaustrieb. Die Kätzchen sind sitzend oder kurz gestielt und weisen eine ovale bis kurz zylindrische Form mit ca. 2 – 4 cm Länge auf. Die ♀ Blüten bein-

halten deutlich gestielte und behaarte Fruchtknoten. Die Griffel sind sehr kurz oder fehlen. Die ♂ Blüte besitzt zwei Staubfäden, welche kahl sind oder nur wenige Haare besitzen. Die Tragblätter der Blüten sind zweifarbig mit heller Basis, dunklem vorderen Teil und langen Haaren. Diese Art ist in Europa und Asien vorkommend. Zu finden ist diese Spezies in Waldlichtungen, Hecken und Gebüsch, an Waldrändern, feuchten Wegrändern, auf Brach- und Ruderalflächen. (Aas, 2016; Schmeil und Fitschen, 2016)

Nach Skvortsov und Zinovjev (1999) wird diese Art in die Subgattung *Vetrix*, die 15. Sektion *Vetrix* und schließlich in die Subsektion *Laeves* eingegliedert.

Phytochemisch wurden auch bei *S. caprea* zahlreiche Studien durchgeführt (Binns et al., 1968; Egloff, 1982; Foo und Porter, 1978; Hallgren et al., 2003; Julkunen-Tiitto, 1989b; Julkunen-Tiitto et al., 1988; Julkunen-Tiitto, 1986, 1985a; Pohjamo et al., 2003; Tahvanainen et al., 1985; Thieme, 1968, 1965d, 1965b, 1964b). Dabei soll besonders auf die Arbeit von Julkunen-Tiitto und Mitarbeitern (1988) hingewiesen werden, in der die Variation im Gehalt der phenolischen sekundären Inhaltsstoffe in verschiedenen Geweben untersucht wurde. Tahvanainen et al. (1985) schlossen diese Spezies in einer Studie ein, welche die Expression phenolischer Verbindungen („phenolische Glykoside“ und „Catechin-Fraktionen“) als Fraßschutz gegen Schneehasen im Fokus hatte. Spannend sind auch die Resultate, die Foo und Porter (1978) erarbeiteten, die kondensierte Gerbstoffe vom PD-Typ in *S. caprea* zu verifizieren. Deprez et al. (1999) nutzten diese Weide als Modell zur Untersuchung der PA-Biosynthese durch die ¹⁴C radioaktiv markierte Vorstufe Phenylalanin.

2.4.5 *Salix cinerea* L.



Abb. 2-11: Habitus (links) und Vorder- und Rückseite eines Blattes (rechts) von *Salix cinerea* L. Die Bilder wurden im Ökologisch-Botanischen Garten der Universität Bayreuth (Deutschland) aufgenommen.

Bei *Salix cinerea* L. (Grau-Weide, Asch-Weide) handelt sich um einen bis zu 6 m hohen halbkugelig-abgeflachten Strauch, sehr selten mit einem baumförmigen Habitus (vgl. **Abb. 2-11**, links). Die diesjährige und in der Regel auch vorjährige Sprossachse ist dicht samtig grau behaart. Die Winterknospen sind grau oder braun gefärbt und behaart. Das entrindete Holz der zwei- bis vierjährigen Zweige zeigt deutliche 5 - 30 mm lange Längsstriemen. Die Nebenblätter sind rundlich, meist deutlich und nur selten fehlend. Die Spreite ist schmal oval bis länglich, wobei die größte Breite der Blätter meist in oder über der Mitte zu finden ist, was meist in einer verkehrt eiförmigen Form resultiert. Die meist 5 - 10 cm, in Teilen auch 12 cm, langen und 2 - 4 cm, teils 5 cm, breiten Blätter sind zwei- bis viermal so lang wie breit. Weiter zeigt jede Blatthälfte mindestens zehn Seitenerven. Am Rand sind die Blätter unregelmäßig kerbig gesägt bis ganzrandig. Die Oberseite ist nicht oder nur wenig runzelig, matt grün und zumindest zu Beginn grau behaart. Die Unterseite ist stets dicht behaart und graugrün gefärbt (vgl. **Abb. 2-11**, rechts). Die Blütezeit ist während März und April vor dem Laubaustrieb. Die Kätzchen sind beinahe sitzend oder bis zu 2 cm lang gestielt und zeigen eine ovale, längliche Form von 2 - 5 cm Länge. Die Fruchtknoten der ♀ Blüten sind gestielt, behaart und zeigen kurze Griffel, die etwa die Länge der Narbenäste aufweisen. Die beiden Staubfäden der ♂ Blüte sind an der Basis meist behaart. Die Tragblätter der Blüten sind zweifarbig mit heller Basis, dunklem vorderen Teil und tragen lange Haare. Das Verbreitungsgebiet erstreckt sich von Europa bis in die westlichen Gebiete Asiens. Diese Art kann an Ufern, in Gräben, Mooren, Erlenbrüchen, auf

Nasswiesen und feuchten und nassen Ruderalstandorten entdeckt werden (Aas, 2016; Schmeil und Fitschen, 2016, 2016).

Weiter wird von der typischen *S. cinerea* ssp. *cinerea* die Subspezies *Salix cinerea* ssp. *oleifolia* (SM.) MACREIGHT (rostrote Grau-Weide, Synonym: *Salix atrocinerea* BROTH.) unterschieden. Bei dieser handelt es sich um einen Strauch oder bis zu 12 m hohen Baum. Die Differenzierung zur typischen Subspezies geschieht über die Haare auf den Blattunterseiten. So sind hier im Gegensatz zur *S. cinerea* ssp. *cinerea* neben den hellen auch noch rostfarbene Haare vorhanden. Das Ausbreitungsgebiet dieser Subspezies ist West-, Südwesteuropa und das westliche Mitteleuropa (Aas, 2016).

Nach Skvortsov und Zinovyev (1999) wird diese Art, wie *S. caprea*, in die Subgattung *Vetrix*, die 15. Sektion *Vetrix* und schließlich in die Subsektion *Laeves* eingegliedert.

Auch diese Weide war Gegenstand einiger phytochemischer Arbeiten bzgl. der phenolischen sekundären Inhaltsstoffe (Binns et al., 1968; Egloff, 1982; Julkunen-Tiitto, 1989b, 1986; Sticher et al., 1981; Thieme, 1968, 1965d, 1965b).

2.4.6 *Salix caprea* x *cinerea*

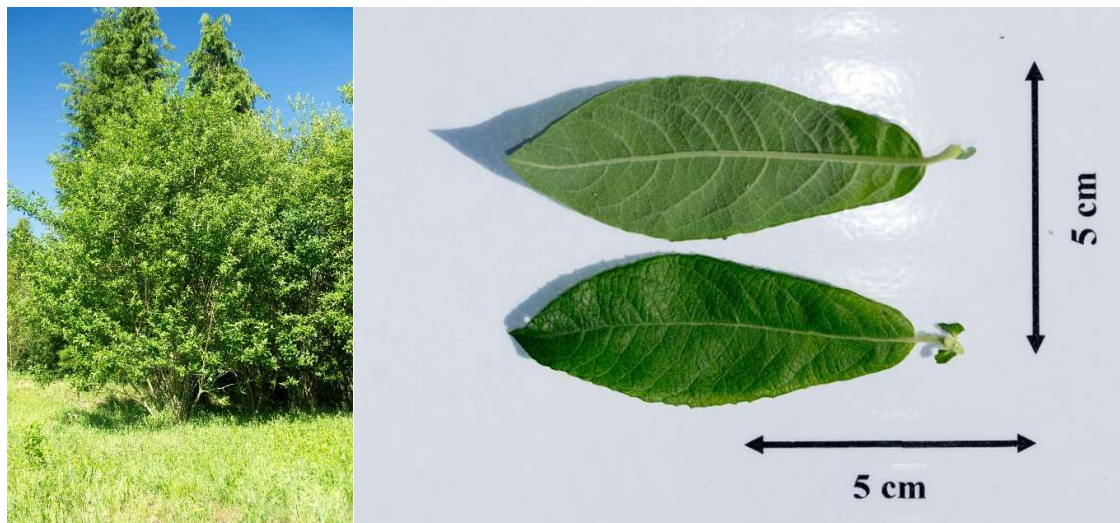


Abb. 2-12: Habitus (links) und Vorder- und Rückseite eines Blattes (rechts) von *Salix caprea* x *cinerea* L. (Synonym: *Salix* x *reichardtii* A. KERN.). Die Bilder wurden im Ökologisch-Botanischen Garten der Universität Bayreuth (Deutschland) aufgenommen.

Bei *Salix caprea* x *cinerea* (Reichardts Weide, Synonym: *Salix* x *reichardtii* A. KERN.) handelt es sich um einen Hybriden mit den Elternarten *S. caprea* und *S. cinerea*. Der Habitus kann von einer strauchartigen bis hin zu kleinen baumartigen Formen variieren (vgl. **Abb. 2-12**, links). Die Zweige sind zunächst behaart, später jedoch kahl, schwach glänzend und rotbraun gefärbt. Das entrindete Holz kann wenige Striemen zeigen, die jedoch auch fehlen können. Die Blätter können verschiedene Formen aufweisen. In der Regel sind sie umgekehrt eiförmig oder breit elliptisch. Die Oberseite zeigt eine dunkelgrüne Färbung, während die Unterseite aschgrau und kahl oder mehr oder weniger dicht behaart sein kann. Weiter zeigt die Unterseite eine ausgeprägte Nervatur der Gefäße. Die Blattränder sind üblicherweise wellig (vgl. **Abb. 2-12**, rechts). Im Gegensatz zu diesem Hybriden zeigt *S. caprea* kräftigere Zweige, größere Kätzchen und breitere, eiförmigere oder nahezu kugelförmige Blätter (siehe Kapitel **2.4.4**). Dagegen weist der Elternteil *S. cinerea* schmälere, umgekehrt eiförmige bis längliche Blätter auf (siehe Kapitel **2.4.5**). Dieser Bastard ist an Waldrändern und an Ufern von Seen, Flüssen und Bächen zu finden (Stace et al., 2015).

Systematisch wurde dieser Hybrid nicht von Skvortsov und Zinovjev (1999) erfasst, soll aber für die Betrachtungen der vorliegenden Arbeit wie seine Eltern auch dem Subgenus *Vetrix* und der 15. Sektion *Vetrix* zugeordnet werden.

Eine Literaturrecherche konnte keine phytochemischen Arbeiten bzgl. des phenolischen Inhaltsstoffspektrums dieser Weide zu Tage fördern.

2.4.7 *Salix dasyclados* WIMM.



Abb. 2-13: Habitus (links) und Vorder- und Rückseite eines Blattes (rechts) von *Salix dasyclados* WIMM. Die Bilder wurden im Ökologisch-Botanischen Garten der Universität Bayreuth (Deutschland) aufgenommen.

Bei *Salix dasyclados* WIMM. (Filzast-Weide) handelt es sich um einen Strauch oder bis zu 6 m hohen Baum (vgl. **Abb. 2-13**, links). Diese Art wird auch als möglicher Bastard *S. caprea* x *S. cinerea* x *Salix viminalis* L. diskutiert. Die Sprossachse ist bis ins zweite Jahr dicht filzig und meist abstehend behaart. Die Äste zeigen weiter eine schmutzigbraune bis schwarzfilzige Farbe. Das Holz der entrindeten zwei- bis vierjährigen Triebe zeigt kurze Striemen (< 4 mm). Längliche Nebenblätter sind deutlich vorhanden. Die Blätter zeigen eine längliche Spreite mit einer Breite von 2 - 4 cm und einer Länge von 8 - 15 cm, teilweise sogar bis zu 23 cm. Dabei sind die Blätter in der Regel 2,5 - 6-fach so lang wie breit. Die Ränder sind unregelmäßig kerbig gesägt bis ganzrandig und meist etwas nach unten umgerollt. Die Oberseite ist nahezu kahl und zeigt eine mehr oder weniger glänzende grüne Farbe. Die Unterseite ist dagegen grau, mehr oder weniger behaart, durch anliegende Haare leicht schimmernd oder bis auf die Nervatur kahl (vgl. **Abb. 2-13**, rechts). Die Blütezeit findet im März und April vor dem Laubaustrieb statt. Die Kätzchen sind fast sitzend oder kurz gestielt mit einer Länge von 2 - 5 cm und ovaler bis länglicher Form. Die ♀ Blüten besitzen kurz gestielte, behaarte Fruchtknoten mit langen Narben und Griffeln, die etwa die halbe Länge der Fruchtknoten zeigen. Die ♂ Blüten beinhalten zwei meist kahle Staubfäden. Die Tragblätter der Blüten sind zweifarbig mit heller Basis, dunklem vorderen Teil und langen Haaren. Das Verbreitungsgebiet erstreckt sich vom nordöstlichen Mitteleuropa bis Osteuropa, dabei wurde diese Spezies häufig als Bienen- und Korbweide kultiviert und verwilderte. Sie kann in den Auen tieferer Lagen, in Augebüschen, Flussufern oder auch in Kulturen gefunden werden (Aas, 2016; Schmeil und Fitschen, 2016).

Von Skvortsov und Zinovjev (1999) wurde diese Art in die Subgattung *Vetrix* und die 17. Sektion *Vimen* eingruppiert.

S. dasyclados war neben anderen Weiden Gegenstand einer chemotaxonomischen Studie in Finnland vorkommender *Salix* Spezies (Julkunen-Tiitto, 1989b). Sie wurde aber auch in ökologische Projekte integriert. So untersuchten Hoeber et al. (2017) die Biomasseproduktion und den Stickstoffhaushalt von Weiden in Mono- und Mischkulturen. Weiter wurde diese Spezies zusammen mit *S. viminalis* (Lehrman et al., 2012) und ihrer F2 Hybride (Torp et al., 2013) in Studien bzgl. der Interaktion mit einem herbivoren Blattkäfer eingeschlossen.

2.4.8 *Salix elaeagnos* SCOP.

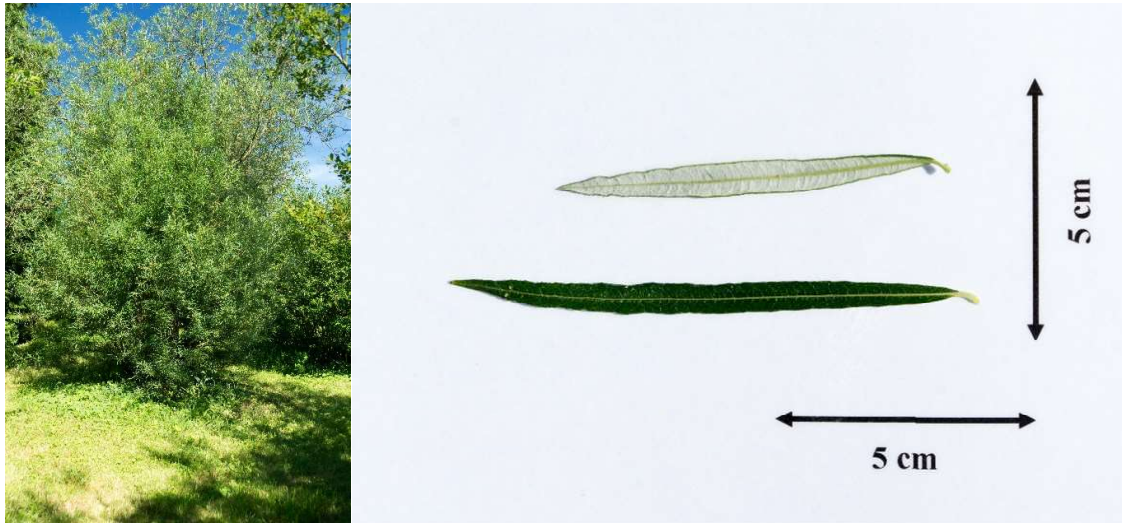


Abb. 2-14: Habitus (links) und Vorder- und Rückseite eines Blattes (rechts) von *Salix elaeagnos* SCOP. Die Bilder wurden im Ökologisch-Botanischen Garten der Universität Bayreuth (Deutschland) aufgenommen.

Bei *Salix elaeagnos* SCOP. (Lavendel-Weide, alternative Schreibweise: *S. eleagnos*) handelt es sich um einen großen Strauch oder selten auch um einen bis zu 20 m hohen Baum (vgl. **Abb. 2-14**, links). Die Sprossachse ist zu Beginn mehr oder weniger behaart und im Laufe der Zeit verkahlend. Die oft glänzenden Zweige weisen eine gelbliche bis olivgrüne oder rot- bis dunkelbraune Färbung auf. Die länglichen Nebenblätter sind nur an kräftigen Trieben zu finden, fehlen häufig oder sind nicht deutlich ausgeprägt. Die Blätter haben eine länglich-linealische Spreite mit lang ausgezogener Spitze mit einer Länge von 3 - 15 cm und einer Breite von 0,5 - 2 cm. Sie sind dabei mindestens siebenmal so lang wie breit, am Rand umgerollt und ganzrandig oder seltener undeutlich kerbig gesägt. Die Oberseiten sind anfangs behaart, im weiteren Verlauf verkahlend und schließlich dunkelgrün gefärbt. Die Unterseiten sind filzig matt weißgrau behaart, sodass die Epidermis gänzlich verdeckt ist (vgl. **Abb. 2-14**, rechts). Blütezeit findet zwischen März und Mai kurz vor oder mit dem Laubaustrieb statt. Die Kätzchen sind kurz gestielt, haben an der Basis oft Blättchen und zeigen eine Länge von 2 - 6 cm. Weiter stehen die Blütenstände mehr oder weniger waagrecht ab oder sind meist abwärts gekrümmt. Weiter zeigen sie eine schlanke, zylindrische Form. Die Fruchtknoten der ♀ Blüten sind kurz gestielt, kahl und während der Blütezeit durch die Tragblätter mehr oder weniger verdeckt, so dass lediglich Griffel und Narbe sichtbar sind. Die Griffel sind lang und die Narbenäste weisen etwa die gleiche Länge auf. Die beiden Staubblätter der ♂ Blüten sind oft in der unteren Hälfte verwachsen und an der Basis behaart. Die Tragblätter der Blüten sind einfarbig gelbgrün oder an der Spitze rötlich bis braun und nur zerstreut mit kurzen Haaren versehen.

Das Ausbreitungsgebiet erstreckt sich über die Gebirge Süd- und Mitteleuropas sowie Kleinasien. Diese Art kann in Weidengebüschen an Ufern von Gebirgsbächen und -flüssen, Fluss- und Bachauen mit Kies- und Schotterfluren und an Hangrutschungen gefunden werden (Aas, 2016; Schmeil und Fitschen, 2016).

Von Skvortsov und Zinovjev (1999) wurde diese Weide dem Subgenus *Vetrix* und der 19. Sektion *Canae* zugeordnet.

In einer phytochemischen Arbeit wurde im Rahmen der Validierung eines Extraktionsverfahrens von Wagner und Mitarbeitern (2008) der Salicingehalts nach Hydrolyse der phenolischen Glykoside mittels einer HPTLC-Methode aus der Rinde einer *S. elaeagnos* bestimmt.

2.4.9 *Salix daphnoides* VILL.

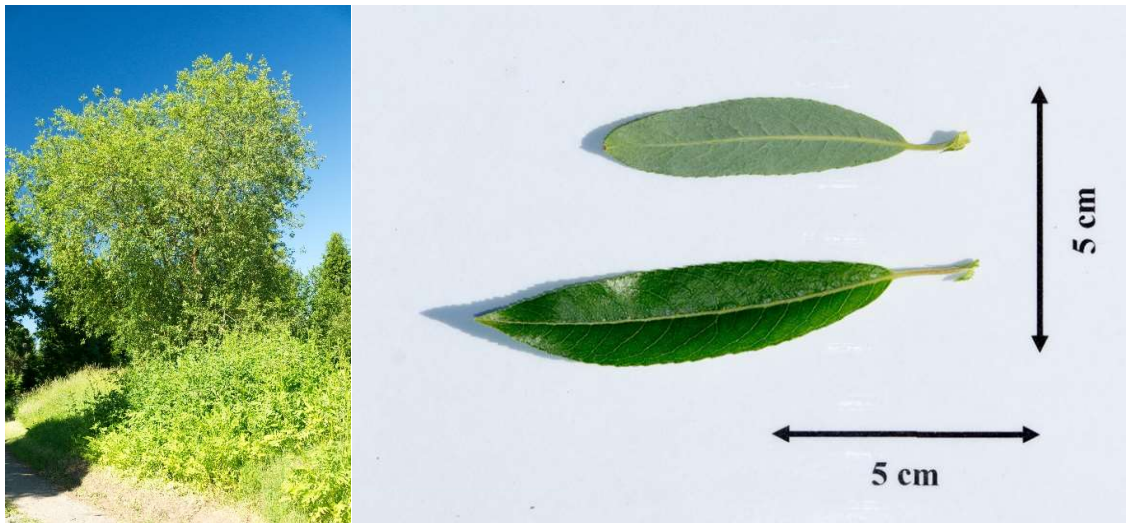


Abb. 2-15: Habitus (links) und Vorder- und Rückseite eines Blattes (rechts) von *Salix daphnoides* VILL. Die Bilder wurden im Ökologisch-Botanischen Garten der Universität Bayreuth (Deutschland) aufgenommen.

Bei *Salix daphnoides* VILL. (Reif-Weide) handelt es sich um große Sträucher oder bis zu 10 m seltener sogar bis zu 20 m hohen Bäume (vgl. **Abb. 2-15**, links). Die meist glänzenden dicken Zweige sind rot bis braun gefärbt, stellenweise abwischbar bläulich-weiß bereift (glauk) und am Grund abbrechbar. Die jungen Sprossachsen sind zu Beginn mehr oder weniger behaart und später kahl. Die Nebenblätter sind meist deutlich ausgeprägt, eiförmig und mit dem Blattstiel verwachsen, so dass sie beim Entfernen des Blattes häufig am Blattstiel bleiben. Die Spreite der Blätter ist oval bis länglich. Die größte Breite befindet sich meist in der vorderen Hälfte der 4 - 12 cm langen und 1,5 - 4 cm breiten Blätter. Dabei sind die länglich-lanzettlichen Blätter in der Regel bis zu fünfmal so lang wie breit. Die Blattränder sind gesägt und anfangs mehr oder weniger behaart und später kahl. Die Oberseite gestaltet sich glänzend dunkelgrün, die Unterseite matt graugrün und mehr oder weniger glauk (vgl. **Abb. 2-15**, rechts). Die Blütezeit erstreckt sich von Februar bis April vor dem Laubaustrieb. Die Kätzchen sind sitzend bis kurz gestielt, eiförmig bis länglich mit einer Länge von 2 - 5 cm. Die kurz gestielten Fruchtknoten der ♀ Blüten sind meist kahl, seitlich zusammengedrückt und besitzen lange Griffel. Die ♂ Blüten zeigen zwei kahle Staubfäden, welche etwa dreimal so lang wie die Tragblätter sind. Die Tragblätter der Blüten sind zweifarbig mit einer hellen Basis, dunklem vorderen Teil und langen Haaren. Diese Art ist in Europa beheimatet. Gefunden wird sie vor allem im Gebirge bis in die subalpinen Bereiche an Bach- und Flussufern, in Kies- und Schotterauen und Küstendünen (Ostsee). Weiter wurde diese Spezies als Zierstrauch gepflanzt und ist anschließend verwildert (Aas, 2016; Schmeil und Fitschen, 2016).

In der systematischen Einteilung nach Skvortsov und Zinovjev (1999) wird diese Spezies in der Untergattung *Vetrix* und der 22. Sektion *Daphnella* eingruppiert.

S. daphnoides war Gegenstand vieler phytochemischen Untersuchungen (Binns et al., 1968; Egloff, 1982; Förster et al., 2010; Förster et al., 2008; Julkunen-Tiitto, 1989b; Julkunen-Tiitto und Gebhardt, 1992; Krauze-Baranowska et al., 2013; Meier et al., 1986, 1985a; Meier et al., 1985b; Poblocka-Olech et al., 2010; Poblocka-Olech und Krauze-Baranowska, 2008; Poblocka-Olech et al., 2007; Sticher et al., 1981). Dabei soll auf eine Arbeit von Poblocka-Olech und Krauze-Baranowska (2008) aufmerksam gemacht werden, in der eine HPTLC-Methode zum Screening auf dimere PCs in Weiden entwickelt und neben anderen Spezies auf diese Weide angewendet wurde. Außerdem wurden auch die jahreszeitlichen Verläufe der Salicylal-kohole in dieser Art erfasst (Förster et al., 2010; Förster et al., 2008; Meier et al., 1985a). Weiter wurde auch die Membrangängigkeit phenolischer sekundärer Metabolite aus *S. daphnoides* *in vitro* in einem Dialyseexperiment untersucht (Gawlik-Dziki et al., 2014). Zudem untersuchten Gawlik-Dziki et al. (2014) den Extrakt der Rinde eines Vertreters dieser Art auf die Eignung als Radikalfänger, chelatisierende Effekte, reduzierende Eigenschaften sowie auf die Inhibition der Lipxygenase und Xanthinoxidase.

2.4.10 *Salix repens* L.



Abb. 2-16: Habitus (links) und Vorder- und Rückseite eines Blattes (rechts) von *Salix repens* ssp. *dunensis* ROUY (Synonyme: *S. arenaria* L., *S. argentea* SM., *S. repens* ssp. *argentea* (SM.) A. CAMUS & E.G. CAMUS). Die Bilder wurden im Ökologisch-Botanischen Garten der Universität Bayreuth (Deutschland) aufgenommen.

Bei *Salix repens* L. (Kriech-Weide) handelt es sich um einen meist bis zu 1,5 m höchstens 2 m hohen Strauch (vgl. **Abb. 2-16**, links). Die Zweige sind aufrecht oder niederliegend bis aufsteigend. Sie sind des Weiteren auch unterirdisch kriechend und wurzelnd. Die Sprossachse ist zu Beginn seidig bis filzig behaart und im späteren Verlauf kahl. Längliche Nebenblätter können nur an kräftigen Trieben gefunden werden und sind sonst wenig deutlich oder fehlen gänzlich. Die Spreite der 1 - 5 cm langen und bis zu 2 cm breiten Blätter ist oval bis länglich. Die Blätter sind in der Regel zwei- bis fünfmal so lang wie breit und weisen bis zu acht Paar Seitennerven auf. Die Blattränder gestalten sich ganzrandig oder mit wenigen und undeutlichen Zähnen. Die Blätter sind anfangs beidseitig hellgrau seidig bis filzig behaart. Die Oberseite ist oft verkahlend und in der Folge grün gefärbt. Die Unterseite ist grau (glauk) und meistens bleibend anliegend hell silbrig behaart und nur selten verkahlend (vgl. **Abb. 2-16**, rechts). Die Blütezeit findet in April und Mai kurz vor oder seltener mit dem Laubaustrieb statt. Die Kätzchen sind kurz getielt, oval bis kurz zylindrisch und besitzen eine Länge zwischen 0,8 - 3 cm. Die Fruchtknoten der ♀ Blüten sind deutlich gestielt, meist dicht behaart und nur selten nahezu kahl. Die Griffel und Narben sind kurz. Die beiden Staubblätter der ♂ Blüten sind kahl oder an der Basis etwas behaart. Die Tragblätter der Blüten gestalten sich zweifarbig mit heller Basis, dunklem vorderen Teil und langen Haaren. Ausbreitungsgebiet ist das westliche Eurasien. Standorte sind Moore, Heiden, Magerrasen, feuchte Gräben und Küstendünen (Aas, 2016; Schmeil und Fitschen, 2016).

Die im Folgenden aufgeführten Unterarten sind ohne die Blätter nicht zu differenzieren (Aas, 2016; Schmeil und Fitschen, 2016):

S. repens ssp. *repens*: Die Blätter sind meist mindestens zwei bis fünfmal so lang wie breit. Die Oberseiten sind kahl oder wenig behaart. Standorte sind Moore, Heiden, Magerrasen und feuchte Gräben.

S. repens ssp. *dunensis* ROUY: Synonyme sind *S. arenaria* L., *S. argentea* SM. und *S. repens* ssp. *argentea* (SM.) A. CAMUS & E.G. CAMUS (Sand- oder Dünen-Kriech-Weide). Die Blätter sind höchstens 2,5-mal so lang wie breit und auf der Oberseite mehr oder weniger behaart. Diese Unterart ist auf Küstendünen zu finden.

Salix rosmarinifolia L.: Auch geführt unter dem Synonym *S. repens* ssp. *rosmarinifolia* (L.) ČELAK. Bzgl. dieser mutmaßlichen Unterart ist nicht geklärt, ob es sich nicht um eine eigene Spezies handelt (Aas, 2016). Die Blätter sind meist fünf bis zehnmal so lang wie breit und zeigen meist mindestens acht Paar Seitennerven. Die Blütenkätzchen sind hier eher rundlich. Das Ausbreitungsgebiet erstreckt sich über Mittel- und Osteuropa. Diese Weide kann in Mooren gefunden werden.

Skvortsov und Zinovjev (1999) gliederten diese Art in den Subgenus *Vetrix* und die 23. Sektion *Incubaceae* ein.

Diese Art wurde auch phytochemisch bzgl. phenolischer Inhaltsstoffe in einigen Studien analysiert (Egloff, 1982; Hallgren et al., 2003; Julkunen-Tiitto, 1989b; Lindroth und Pajutee, 1987; Thieme, 1968, 1965d, 1965b). Dabei untersuchten Hallgren und Mitarbeiter (2003) die Einflüsse der Hybridisierung und interpretierten die Ergebnisse bzgl. des Ansprechens auf Herbivoren durch die Hybride. Im Rahmen genannter Untersuchung wurden die kondensierten Gerbstoffe (= PAs) und selektierte phenolische Glykoside in dieser Art, *S. caprea* und deren F1 und F2 Hybride erfasst und diskutiert. Lindroth und Pajutee (1987) führten neben anderen Vertretern der Salicaceae (hier waren auch Pappeln einbezogen) Experimente bzgl. der Artefaktbildung phenolischer Glykoside für diverse Aufarbeitungsmethoden durch.

2.4.11 *Salix purpurea* L.

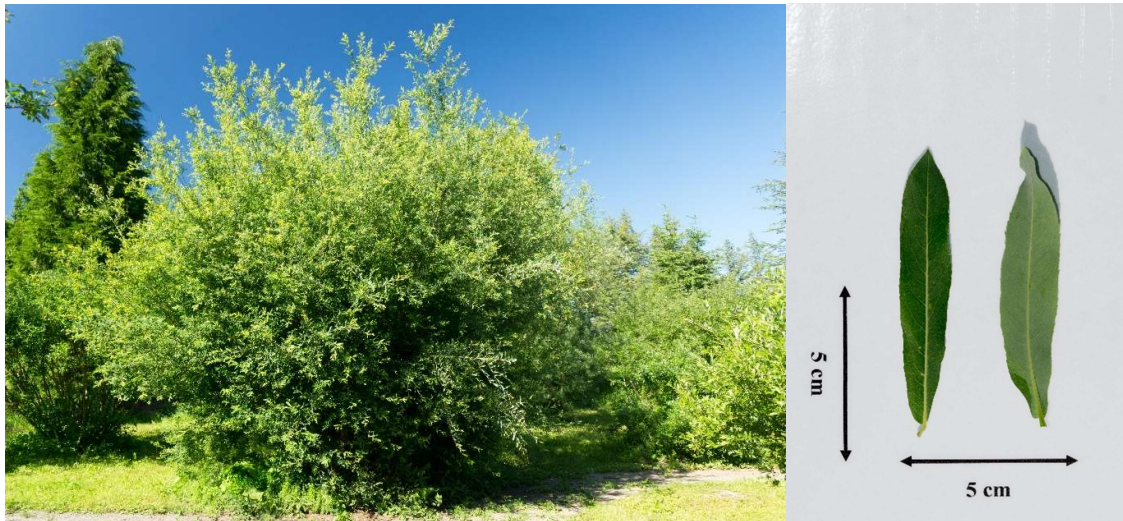


Abb. 2-17: Habitus (links) und Vorder- und Rückseite eines Blattes (rechts) von *Salix purpurea* L. Die Bilder wurden im Ökologisch-Botanischen Garten der Universität Bayreuth (Deutschland) aufgenommen.

Der Habitus der *Salix purpurea* L. (Purpur-Weide) gestaltet sich in der Regel als Strauch oder sehr selten als bis zu 10 m hohen Baum (vgl. **Abb. 2-17**, links). Die dünnen und biegsamen Zweige sind gelblich braun oder lebhaft purpurpurrot gefärbt (vgl. **Abb. 2-18**). Die Sprossachse ist zu Beginn mehr oder weniger behaart, wird jedoch schnell kahl. Die Blätter sind teils vor allem an der Basis der Triebe schief gegenständig angeordnet. Deren Spreite ist länglich oder lanzettlich, wobei sich die maximale Breite meist in der vorderen Hälfte befindet. Die Blätter sind 3 - 12 cm lang und 0,5 - 2 cm breit und kahl, höchstens zu Beginn flaumig oder zerstreut behaart. Die Ränder sind zur Spitze hin fein gesägt und im unteren Teil mehr oder weniger ganzrandig. Die Unterseiten sind grauweiß (glauk, vgl. **Abb. 2-17**, rechts). Die Blätter werden beim Trocknen, bzw. Welken, mehr oder weniger blauschwarz oder schwarzfleckig. Die Blütezeit erstreckt sich von März bis Mai vor oder mit dem Laubaustrieb. Die Kätzchen sind oft mehr oder weniger gegenständig, sitzend oder sehr kurz gestielt und zeigen eine längliche Form mit einer Länge von 1,5 - 4,5 cm. Die Fruchtknoten der ♀ Blüten sind sitzend, eiförmig und dicht behaart. Die Griffel sind sehr kurz und die Narben sind bis zum Aufblühen rot. Scheinbar besitzen die ♂ Blüten nur ein Staubblatt mit vier Staubbeuteln, jedoch handelt es sich hier um zwei verwachsene Staubblätter. Die Staubbeutel sind vor den Stäuben purpurrot, später gelblich und schließlich schwärzlich. Die Tragblätter der Blüten sind zweifarbig mit heller Basis, dunklem vorderen Teil und langen Haaren. Ausbreitungsgebiet ist das westliche Eurasien. Übliche Standorte sind Ufer- und Auengebüsche, Niedermoore, Quellbereiche, feuchte steinige Hänge,

feuchte Kies- und Sandfluren und feuchte Ruderalflächen (Aas, 2016; Schmeil und Fitschen, 2016).

In der systematischen Einteilung nach Skvortsov und Zinovjev (1999) ist diese Weide in der Subgattung *Vetrix* und der 25. Sektion *Helix* und genauer in der Subsektion *Purpureae* zu finden.

In Bezug auf die phenolischen Inhaltsstoffe stellt diese Art eine der am besten untersuchten Weiden dar (Binns et al., 1968; Egloff, 1982; Förster et al., 2010; Förster et al., 2008; Freischmidt et al., 2015; Hänsel et al., 1960; Julkunen-Tiitto, 1989b; Julkunen-Tiitto und Sorsa, 2001; Jürgenliemk et al., 2007; Krauze-Baranowska et al., 2013; Meier et al., 1986; Meier et al., 1985b; Pearl und Darling, 1970; Poblocka-Olech et al., 2010; Poblocka-Olech und Krauze-Baranowska, 2008; Poblocka-Olech et al., 2007; Sticher et al., 1981; Sulima et al., 2017; Thieme, 1968, 1965d, 1965b, 1965c, 1964c; Zenk, 1967). Dabei erfuhren beispielsweise die PAs im Rahmen eines Screenings mittels einer HPTLC-Methode (Poblocka-Olech und Krauze-Baranowska, 2008) oder im Rahmen einer Isolierungsarbeit (Jürgenliemk et al., 2007) besondere Aufmerksamkeit. In letzterer Arbeit wurde auch der Catechin-3-*O*-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure)-ester isoliert, welcher vorher lediglich in *Salix sieboldiana* BLUME gefunden werden konnte, bei der auch oligomere PAs auf identische Weise verestert waren (Hsu et al., 1985). Somit könnte es sich bei dieser Verbindung um einen interessanten chemotaxonomischen Marker handeln. Eine weitere interessante Verbindung für mögliche chemotaxonomische Differenzierungen, die in dieser Weide gefunden wurde, ist das 6'-*O*-*trans-p*-Cumaroylisosalipurposid (Freischmidt et al., 2012; Freischmidt, 2011), das erstmals in der Rinde von *Salix acutifolia* WILLD. gefunden wurde (Zapesochnaya et al., 2002). Extrakte aus *S. purpurea* waren aber auch Gegenstand einiger pharmkologischen Studien und Betrachtungen (Bonaterra et al., 2010a; Bonaterra et al., 2010b; Freischmidt et al., 2012; Gawlik-Dziki et al., 2014; Hostanska et al., 2007; Khayyal et al., 2005; Knuth et al., 2013; Knuth et al., 2011; Nahrstedt et al., 2007; Schmid et al., 2001b; Schmid et al., 2001a; Ulrich-Merzenich et al., 2012; Vlachoianis et al., 2011).



Abb. 2-18: Rötlich gefärbter diesjähriger Trieb von *Salix purpurea* L. Das Bild wurde im Ökologisch-Botanischen Garten der Universität Bayreuth (Deutschland) aufgenommen.

2.5 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das phenolische Inhaltsstoffspektrum in Weiden untersucht werden. Dabei lag der Fokus besonders auf den Flavan-3-olen und insbesondere auf den PAs. Für diese Aufgabenstellung wurden die folgenden Ziele formuliert:

- 1) Charakterisierung des Spektrums oligomerer Flavan-3-ole aus der Rinde einer *S. daphnoides* durch gezielte Isolierung der entsprechenden Vertreter dieser Stoffklasse. Dabei sollten chromatographische Systeme (Säulenchromatographie, HPLC) zur Gewinnung der Substanzen eingesetzt werden. Die Strukturaufklärung sollte durch etablierte Methoden wie NMR, HRMS, Polarimetrie und CD bewerkstelligt werden.
- 2) Charakterisierung von Fraktionen aus der Rinde einer *S. daphnoides* mit „ungewöhnlichen“ PAs im Vergleich zu den „regulären“ polymeren PAs. Die Anreicherung der entsprechenden Fraktionen sollte über Säulenchromatographie und/oder CPC erreicht werden. So sollten der Gesamtgerbstoffgehalt, der PA-Gehalt zusammen mit der Zusammensetzung der PA-Ketten, der mDP via Thiolyse, die Anwesenheit interessanter Fragmente nach einem Phloroglucinolabbau, strukturelle Eigenschaften via ^{13}C -NMR und stereochemische Eigenschaften via CD und Polarimetrie ermittelt werden.
- 3) Optimierung und Miniaturisierung der Methode 2.8.14 aus dem Ph. Eur. zur Bestimmung des Gesamtphenol- und Gesamtgerbstoffgehalts, um einen hohen Probendurchsatz für Screening-Projekte gewährleisten zu können. Weiter wurde das Ziel gefasst, die Stöchiometrie der zugrundeliegenden Reaktion zu beurteilen.
- 4) Untersuchung der Konzentrationsverläufe der Flavan-3-ole, Salicylalkoholderivate, Phenylpropansäuren, Flavanone und der zusammengefassten Gruppe Flavonoide / Chalkone während einer Wachstumsperiode (Mai bis September) in den diesjährigen Trieben und Blättern von 13 Weidenindividuen. Dabei sollten an Beispielen interindividuelle Unterschiede und Unterschiede zwischen den Geschlechtern herausgearbeitet werden und ein Hybrid mit seinen Eltern verglichen werden. Schlussendlich sollten die genannten phenolischen Stoffgruppen bzgl. ihrer chemotaxonomischen Aussagekraft und eines idealen Erntezeitpunkts zur Gewinnung der Arzneidroge *Salicis cortex* beurteilt werden. Am Beispiel der Blätter eines Probenzugs sollte eine Methodik zur Untersuchung des gesamten Metaboloms via ^1H -NMR erprobt werden.

3 Isolierung phenolischer Verbindungen aus *Salix daphnoides* VILL.

3.1 Hintergrund

Nach sorgfältiger Literaturrecherche (SciFinder®, PubMed.gov, Google Scholar) konnte keine Arbeit gefunden werden, welche systematisch das PA-Spektrum in *Salix daphnoides* VILL. beschreibt. Lediglich eine Arbeit von Pobłocka-Olech und Krauze-Baranowska (2008) schloss diese Art in einem HPTLC-Screening auf dimere PCs ein. Daher wurde hier im Rahmen einer Isolierungsarbeit der Versuch unternommen, das Flavan-3-ol-Spektrum von *S. daphnoides* zu charakterisieren.

3.2 Isolierung oligomerer Procyanidine

3.2.1 Isolierungsstrategie

Zunächst galt es, die PAs möglichst effektiv aus dem *S. d.*-Extrakt (vgl. Kapitel 3.6.2) aufzukonzentrieren. Dabei kam eine Sephadex® LH-20 Säulenchromatographie zum Einsatz. Dieser Fraktionierungsschritt am Anfang war insofern sinnvoll, da eine ausreichende Menge (265 g) dieses Materials für eine verhältnismäßig große Säule zur Verfügung stand. Somit konnten hohe Beladungsmengen in diesem System gewählt werden. Außerdem sind bei diesem Verfahren sowohl Größenausschluss als auch Adsorption die vorherrschenden chromatographischen Trennprinzipien. Durch diese wurden die Flavan-3-ole von den meisten anderen phenolischen Verbindungen des Extrakts abgetrennt. Außerdem war durch dieses Verfahren bereits eine Trennung der oligomeren PAs nach ihren DP's möglich. Wie in Kapitel 3.6.4 beschrieben, wurden zunächst die Fraktionen S.d. S1 bis S.d. S3 in drei Läufen gesammelt. Die Fraktion S.d. S3 wurde anschließend erneut mit dem gleichen System chromatographiert, um die oligomeren PAs aufzutrennen. In **Abb. 3-1** sind die Übersichts-DCs zu den Fraktionen S.d. S3.1 bis S.d. S3.8 gezeigt. Dabei ist besonders auf die mit Vanillin/HCl derivatisierte DC-Platte zu achten, da mit diesem Sprühreagenz die PAs eine rote Färbung bei Tageslicht zeigen.

Als sehr effektiv hat sich der im Anschluss folgende Aufreinigungsschritt an MCI-Gel® CHP20P erwiesen. Damit war es möglich, die stereoisomeren PAs aus den Sephadex®-Fraktionen zu trennen. Dazu kam die in Kapitel 3.6.5 erläuterte Methode zum Einsatz. Ein Beispiel für die Effizienz dieses Verfahren ist in **Abb. 3-2** an der Aufreinigung der Fraktion S.d. S3.2 gezeigt. Hier ist zu erkennen, dass zwei Flavan-3-ole getrennt werden konnten, die im Kieselgel-DC-System identische R_F -Werte aufweisen.

Die finale Isolierung der PAs erfolgte mit den in Kapitel 3.6.6 aufgeführten präparativen HPLC-Methoden. Dabei kamen RP-18- und Diol-Phasen in den Trennsäulen zum Einsatz. Das Isolierungsschema dazu ist in **Abb. 3-3** gezeigt. Insgesamt konnten die Strukturen von neun PCs und die Verbindung 6'-*O-trans-p*-Cumaroylisosalipurposid zweifelsfrei nachgewiesen werden. Eine weitere Verbindung kann über die chemischen Verschiebungen im ^{13}C -NMR-Spektrum als Catechin-(4 α →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin postuliert werden. Weitere 16 PAs konnten isoliert werden, ohne dass ein auswertbarer NMR-Spektrensatz erstellt werden konnte, da die isolierten Stoffmengen viel zu gering waren. Drei finale Fraktionen wurden gewonnen, die sich aus Clustern von quartären und/oder pentameren PAs zusammensetzten. Dabei konnten auch teilweise unterschiedlichen Substitutions- und Verknüpfungsmustern festgestellt werden.

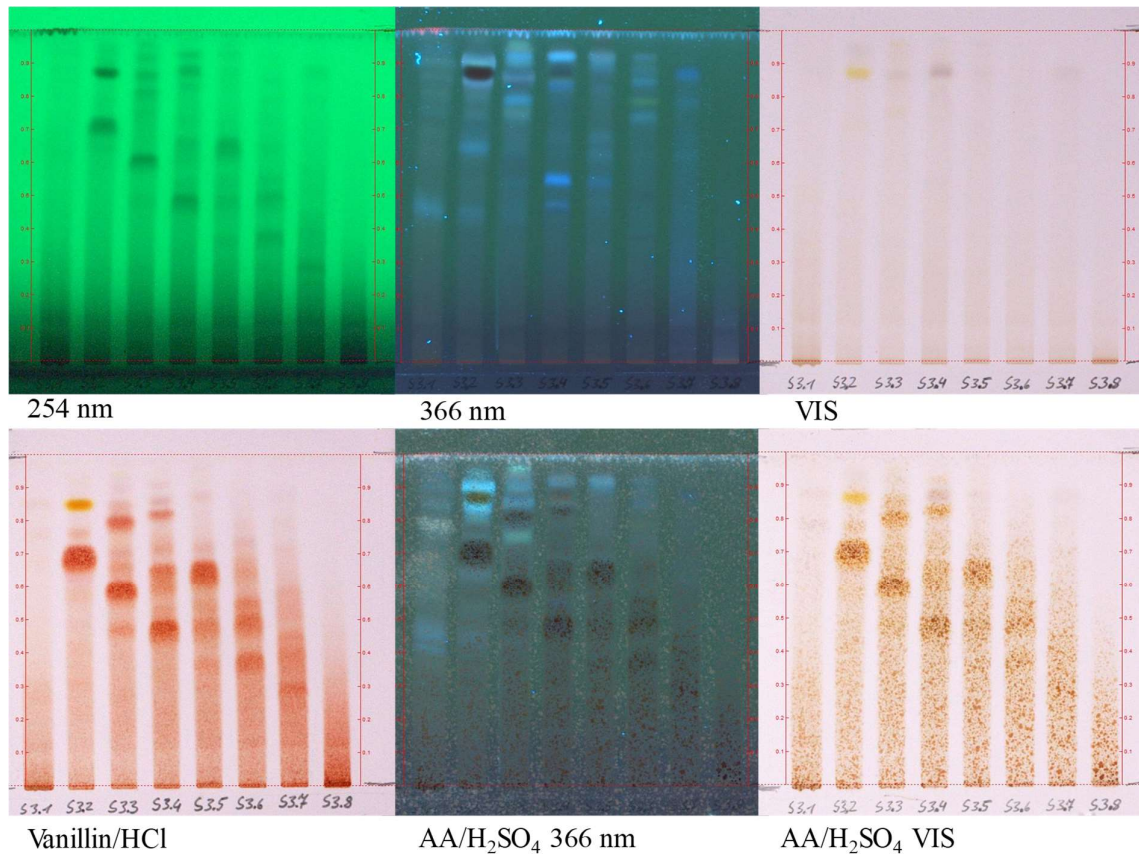


Abb. 3-1: Übersichts-DC zur Auftrennung der Fraktion S.d. S3 an Sephadex® LH-20. Von links nach rechts sind die neu gebildeten Fraktionen S.d. S3.1 bis S.d. S3.8 aufgetragen. DC-Platten: Kieselgel 60 F₂₅₄; Fließmittel: EtOAc/HOAc/FA/H₂O (100+11+11+26 [V/V/V/V]).

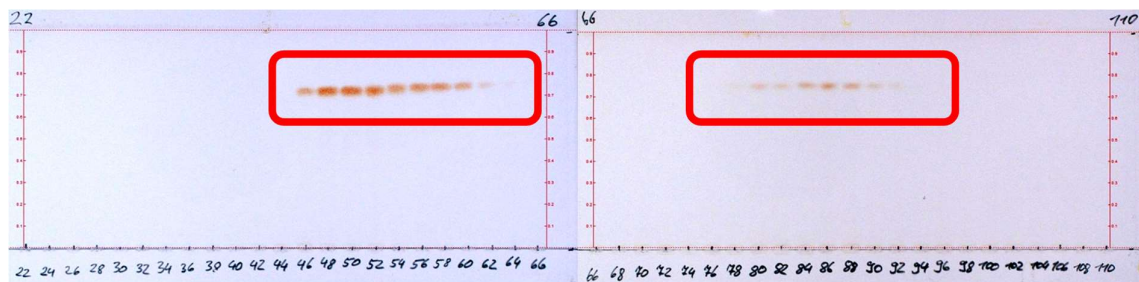


Abb. 3-2: Bsp. aus der Fraktionskontrolle zur Aufreinigung der Fraktion S.d. S3.2 an MCI-Gel® CHP20P. Die markierten Bereiche zeigen Banden verschiedener PCs mit den gleichen R_F -Werten, aber unterschiedlichen Retentionsvolumina bei diesem chromatographischen Verfahren. DC-Platten: Kieselgel 60 F₂₅₄; Fließmittel: EtOAc/HOAc/FA/H₂O (100+11+11+26 [V/V/V/V]); Detektion: Vanillin/HCl bei Tageslicht.

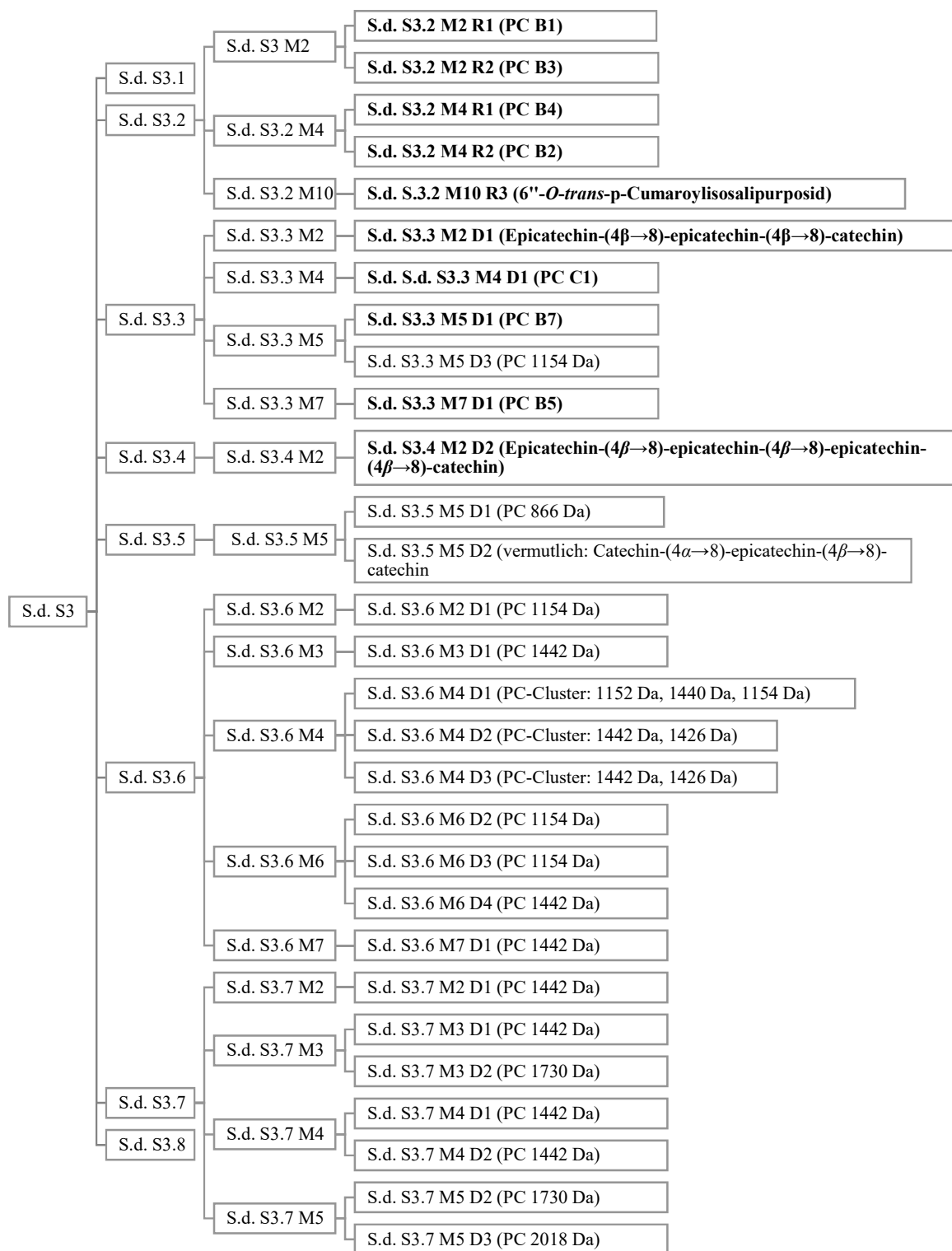
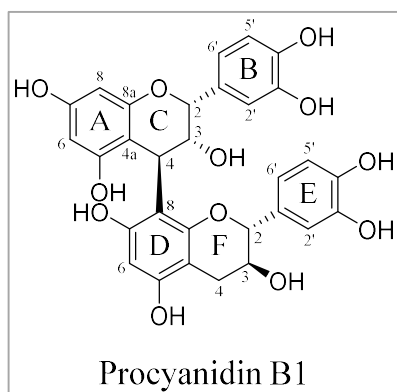


Abb. 3-3: Isolierungsschema beginnend mit der erneuten Chromatographie der Fraktion S.d. S3 an Sephadex® LH-20. Der nächste Schritt war die Fraktionierung an MCI-Gel® CHP20P, gefolgt von der finalen Isolierung an der präparativen HPLC. Die Strukturen der fettgedruckten Verbindungen konnten zweifelsfrei belegt werden.

3.2.2 Procyanidin B1



Verbindung PC B1 eluierte mit Fraktion S.d. S3.2 zwischen 2200 und 2986 mL von der Sephadex® LH-20 Säule (Kapitel 3.6.4). Beim nächsten Fraktionierungsschritt an MCI-Gel® CHP20P wurde diese Substanz zwischen 682 und 1008 mL in der Fraktion S.d. S3.2 M2 detektiert (Kapitel 3.6.5). Die finale Aufreinigung fand an einer präparativen HPLC mit dem HPLC-System A statt. Dabei wurde PC B1 bei $R_t = 10,0$ min UV-metrisch erfasst (S.d. S3.2 M2 R1, vgl. Kapitel 3.6.6). Die Ausbeute betrug nach Lyophilisation 70,9 mg.

Die spektroskopischen Daten der underivatisierten freiphenolischen Verbindung waren kongruent zu Shoji et al. (2003). In **Tabelle 3-1** und **Abb. 3-6** sind die ^{13}C - und ^1H -NMR-Signale der jeweiligen Position im Molekül zugeordnet. Die Tieftemperaturmessung hatte das Ziel, die Rotationsisomerie in diesem Molekül einzuschränken. Trotzdem war die Detektion von Signalen mit kleineren Integralen möglich, die durch ein Rotationsisomer erzeugt wurden. Soweit eine eindeutige Zuordnung dieser Signale möglich war, ist dies ebenfalls in der NMR-Tabelle aufgeführt. Die Verbesserung der Signalauflösung sei hier beispielhaft in **Abb. 3-4** gezeigt. Im Hinblick auf den Strukturnachweis weiterer Fraktionen und zur weiteren Strukturverifizierung wurde ein Aliquot von 9,5 mg peracetyliert (vgl. Kapitel 3.6.7). Durch dieses Verfahren wurden 15,8 mg peracetyliertes PC B1 erhalten, was einer Ausbeute von 96,3% entspricht. Mit dem erhaltenen Peracetat des PC B1 wurde ein ^1H -NMR-Spektrum aufgezeichnet (vgl. Kapitel 3.6.8) und mit den von Kolodziej (1986) erhobenen Daten verglichen. Auch diese Spektren stimmten überein, wodurch die Identität des PC B1 weiter untermauert wurde. Außerdem konnten durch diese Herangehensweise die Signale mit kleineren Integralen im Spektrum des freiphenolischen PC B1 als Signale eines Rotationsisomers bestätigt werden, da diese im Spektrum des Peracetats nicht mehr detektiert wurden. Das kann durch die unterbundene Rotation innerhalb des Moleküls durch die acetylierten Hydroxygruppen erklärt werden. Die relative Stereochemie an C-2 und C-3 der beiden monomeren Einheiten konnten über die Kopplungskonstanten im ^1H -NMR-Spektrum ermittelt werden. Dazu zeigen die sehr kleinen Kopplungskonstanten von H-2 und H-3 in der oberen Einheit eine 2,3-*cis*-Konfiguration an. Diese Kopplungskonstanten sind so klein, dass sie lediglich zu einem bs zusammenfallen. In der unteren Einheit wurde für das H-2 ein d mit $J = 5.0$ Hz detektiert, was auf eine 2,3-*trans*-Konfiguration schlie-

ßen lässt. Die β -Konfiguration an C-4 der oberen Einheit wurde über das CD-Spektrum ermittelt, welches in **Abb. 3-7** gezeigt ist. Da für das freiphenolische PC B1 noch keine CD-Daten in der Literatur gefunden werden konnten (SciFinder®), wurde die von Barret et al. (1979) aufgestellte Hypothese auf dieses Molekül übertragen. Dabei lassen die positiven Cotton Effekte zwischen 220-240 nm auf eine β -Konfiguration des C-4 (C-Ring) schließen (Barrett et al., 1979; Botha et al., 1981; Botha et al., 1978; Esatbeyoglu et al., 2011; Thompson et al., 1972). Damit wurden hier das erste Mal die CD-Daten für das freiphenolische PC B1 erhoben.

Die absolute Stereochemie wurde zusätzlich zum CD über die Polarimetrie bewiesen. Dabei zeigte diese Substanz ein $[\alpha]_{589}^{23}$ von +21,1 (0,1; MeOH), was in einem ähnlichen Bereich mit bisher veröffentlichten Werten liegt (Mohri et al., 2007; Saito et al., 2003). Die ESI-HRMS Messung lieferte mit einem $[M-H]^-$ bei m/z 577,1370 einen wichtigen Hinweis für ein einfach verknüpftes dimeres Flavan-3-ol mit einem dihydroxylierten B- und E-Ring. So wurde durch die insgesamt erhobenen Daten die Verbindung S.d. S3.2 M2 R1 als PC B1 (Epicatechin-(4 β →8)-catechin) bestätigt. Um das Rest-H₂O in dieser Verbindung zu bestimmen, wurde eine Elementaranalyse im Triplikат durchgeführt. Dadurch wurde ein C-Anteil von 55,39% \pm 0,99% und respektive ein H-Anteil von 5,19% \pm 0,05% ermittelt. Die geringste Abweichung zu diesen Werten zeigte PC B1 \cdot 4 x H₂O (C-Anteil: 55,39%, H-Anteil: 5,27%). Diese Parameter waren für Berechnungen und Einwaagekorrekturen für ein weiteres Projekt erforderlich (vgl. Kapitel 5).

Tabelle 3-1: NMR-Tabelle zu PC B1 (freiphenolisch). Die NMR-Messungen wurden bei -40 °C mit einem AVANCE III HD NMR-Spektrometer (^1H -NMR: 400,13 MHz, ^{13}C -NMR: 100,63 MHz, in $\text{MeOH-}d_4$) durchgeführt.

	Pos.	$\delta_{\text{C, major}} + \delta_{\text{C, minors}}$	Typ	$\delta_{\text{H, major}} (J \text{ in Hz}) + \delta_{\text{H, minor}} (J \text{ in Hz})$
obere Einheit	2	77.0 + 76.5, CH		5.10, bs + 5.17, bs
	3	72.9 + 73.4, CH		3.93, d (1.6), 3.83, bs
	4	36.7 + 37.2, CH		4.65, bs + 4.46, bs
	4a	102.2 + 103.7, C		
	5	157.8, C		
	6	95.1, CH		5.92, d (2.4) + 5.66, d (2.4)
	7	158.6, C		
	8	95.6 + 95.2, CH		5.89, d (2.3) + 5.38, d (2.4)
	8a	155.3, C		
	1'	132.7 + 133.4, C		
	2'	114.9 + 115.2, CH		6.85, d (1.4)
	3'	145.4, C		
	4'	145.7, C		
	5'	115.5, CH		6.67 ^a
	6'	119.0 + 119.7, CH		6.67 ^a
untere Einheit	2	81.4 + 82.9, CH		4.97, d (5.0), 3.91, m
	3	68.0 + 69.03, CH		4.16, m + 3.74, m
	4	26.3 + 29.8, CH ₂		2.53, dd (17.0, 5.0) + 2.40, dd (16.3, 9.0) 2.59, dd (17.0, 5.6) + 2.93, dd (16.2, 5.9)
	4a	99.8 + 101.1, C		
	5	155.7, C		
	6	96.5 + 95.6, CH		5.82, s + 6.06, s
	7	156.4, C		
	8	107.6 + 108.7, C		
	8a	153.7, C		
	1'	132.2 + 131.9, C		
	2'	113.7 + 114.9, CH		6.82, d (1.8)
	3'	146.1, C		
	4'	145.7, C		
	5'	115.8, CH		6.70 ^a , d (3.2)
	6'	119.1 + 120.5, CH		6.88, d (8.4)

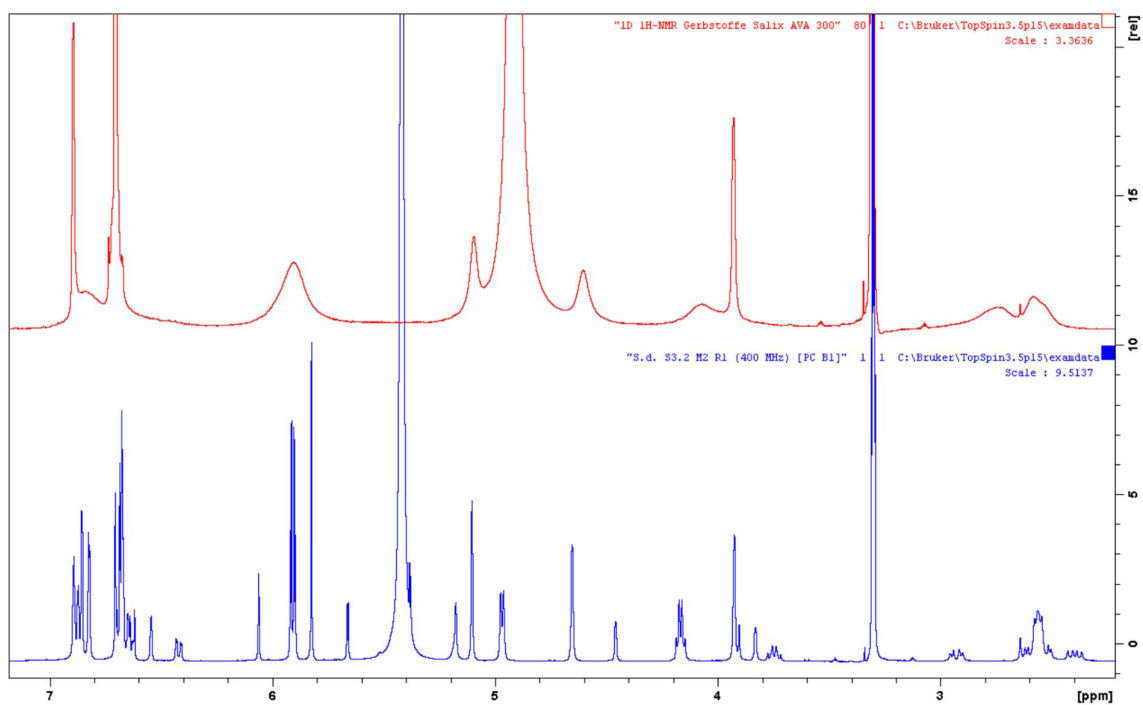


Abb. 3-4: ¹H-NMR-Spektren des PC B1 gelöst in MeOH-*d*₄. Oben (rot) bei RT, AVANCE 300 (300,13 MHz). Unten (blau) bei -40 °C, AVANCE III HD (400,13 MHz).

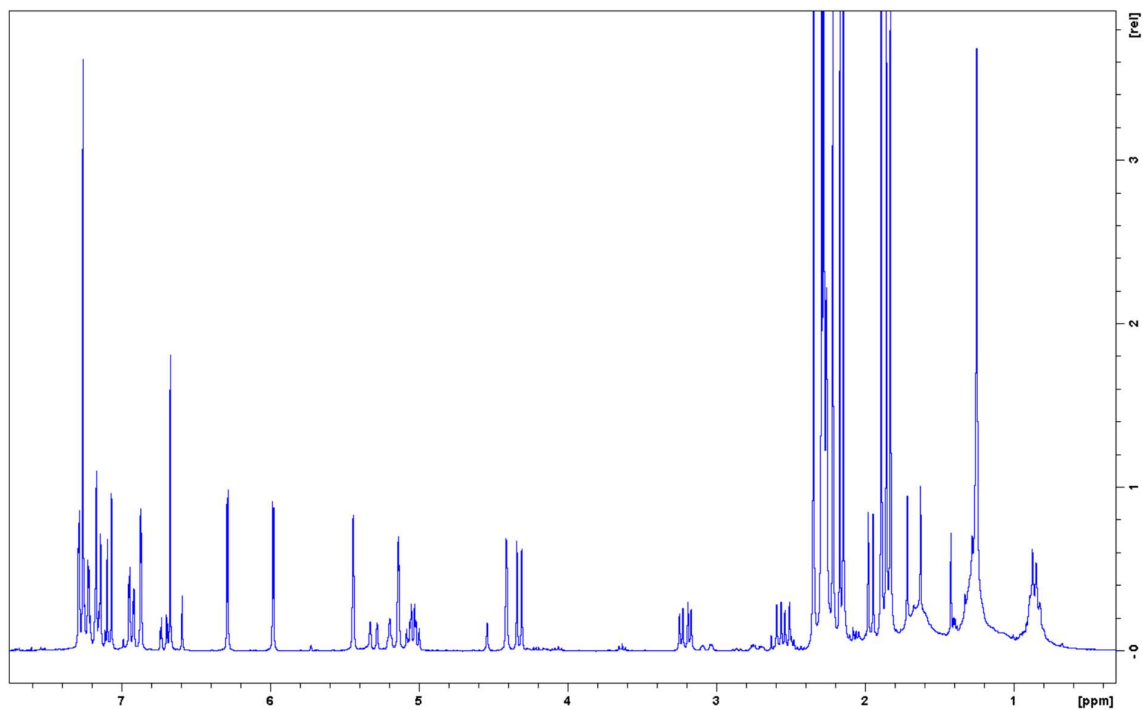


Abb. 3-5: ¹H-NMR-Spektrum des peracetylierten PC B1 gelöst in Chloroform-*d*₁ bei RT, AVANCE 300 (300,13 MHz).

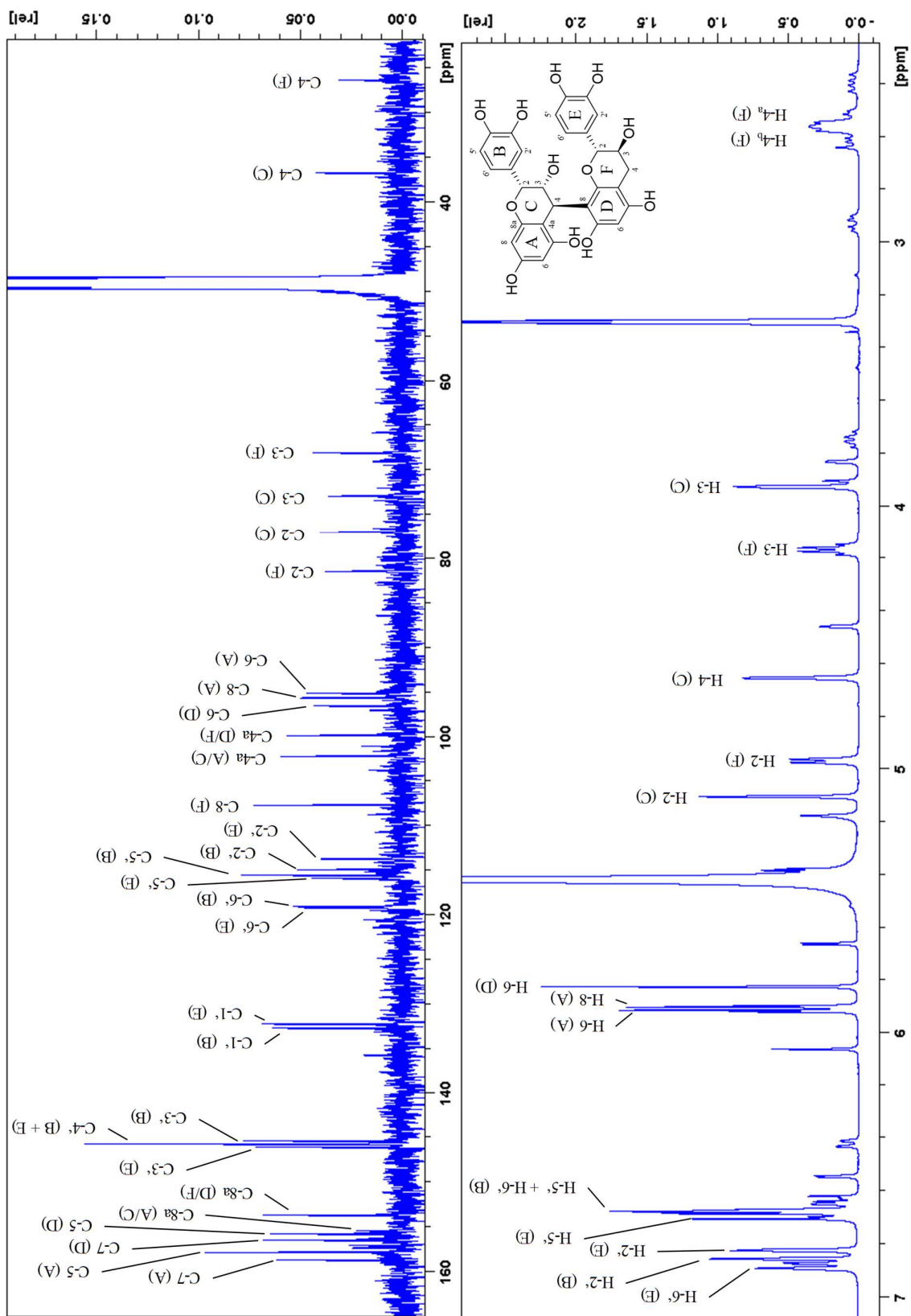


Abb. 3-6: ^{13}C - und ^1H -NMR-Spektrum von PC B1 (S.d. S3.2 M2 R1) gelöst in $\text{MeOH-}d_4$ bei -40°C , AVANCE III HD 400,13 MHz (^1H -NMR) und 100,63 MHz (^{13}C -NMR).

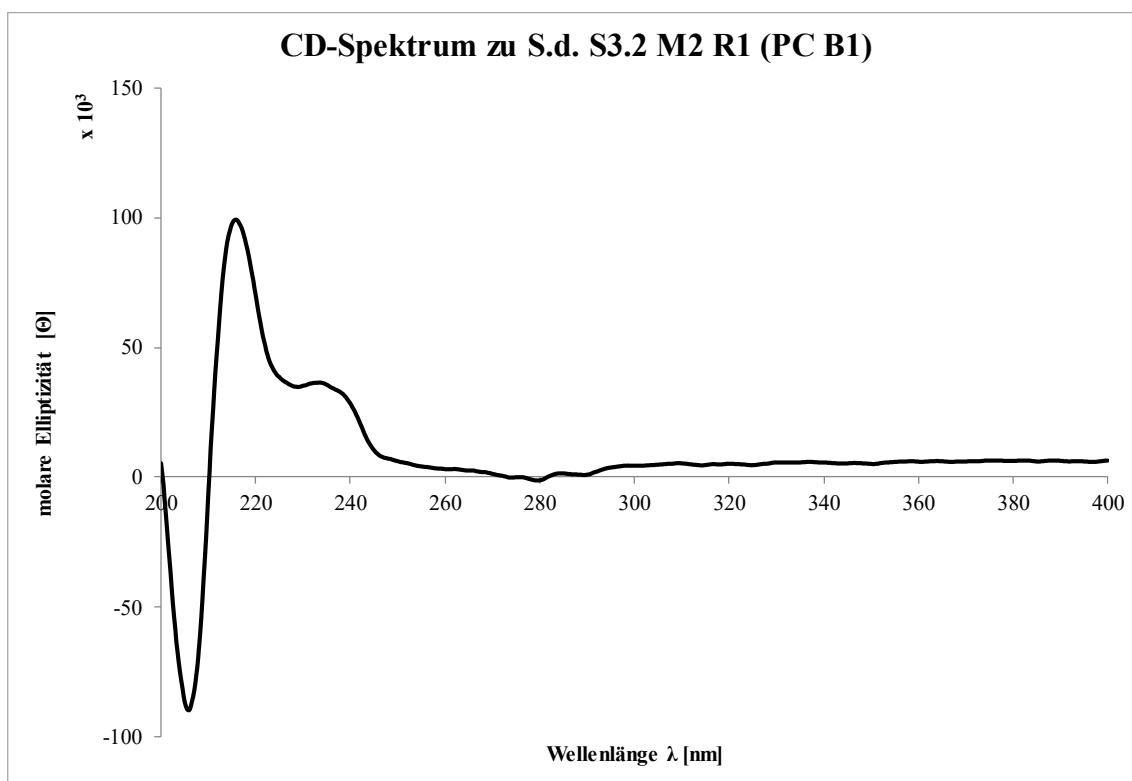
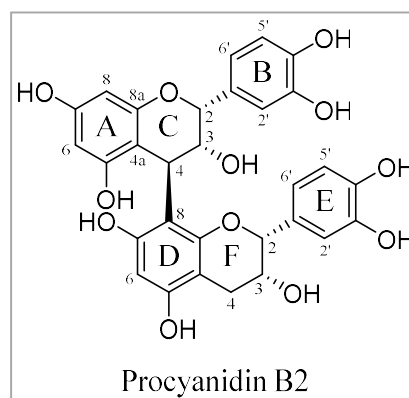


Abb. 3-7: CD-Spektrum zur Verbindung S.d. S3.2 M2 R1, bzw. PC B1. CD (MeOH, Θ) 206 (-89460.7), 216 (+99040.8), 233.5 (+36458.0), 279.5 (-1236.81).

3.2.3 Procyanidin B2

PC B2 eluierte in Fraktion S.d. S3.2 zwischen 2200 und 2986 mL von der Sephadex® LH-20 Säule (vgl. Kapitel 3.6.4). Beim nächsten Fraktionierungsschritt an MCI-Gel® CHP20P wurde diese Substanz zwischen 1147 und 1488 mL in Fraktion S.d. S3.2 M4 detektiert (vgl. Kapitel 3.6.5). Die finale Aufreinigung fand an einer präparativen HPLC mit dem HPLC-System B statt. Dabei wurde diese Verbindung bei $R_t = 12,6$ min (Lauf 1) und $R_t = 13,6$ min (Lauf 2) UV-metrisch erfasst (S.d. S3.2 M4 R2, vgl. Ka-



pitel 3.6.6). Obwohl die R_{ts} der Peaks in den beiden Läufen abwichen, konnte über die Elutionsreihenfolge eine eindeutige Zuordnung erfolgen. Die Ausbeute betrug nach Lyophilisation 11,7 mg.

In **Tabelle 3-2** und **Abb. 3-8** sind die NMR-Signale den jeweiligen Positionen im Molekül zugeordnet. Auch hier waren die spektroskopischen Daten kongruent zu denen von Shoji et al. (2003). Wie bei PC B1 (Kapitel 3.2.2) wurden hier auch, soweit eindeutig bestimmbar, die Signale des energetisch weniger günstigen Rotationsisomers extrahiert. Diese zeigten sich auch hier durch kleinere Integrale als die Hauptsignale. Die 2,3-*cis*-Konfiguration in beiden monomeren Einheiten zeigte sich durch die sehr kleinen Kopplungskonstanten der jeweiligen H-2 und H-3 im C- und F-Ring. Die β -Konfiguration an C-4 wurde über das in **Abb. 3-9** gezeigte CD-Spektrum bewiesen, wie bereits bei PC B1 in Kapitel 3.2.2 erläutert. Außerdem stimmten die CD-Daten mit denen von Barret et al. (1979) überein. Zusätzlich wurde auch hier die absolute Stereochemie über die Polarimetrie abgesichert. Dazu wurde ein $[\alpha]_{589}^{22}$ von +55,6 (0,1; MeOH) ermittelt und fand sich in einem vergleichbaren Bereich wie von Mohri et al. (2007) beschrieben. Mittels einer ESI-HRMS Messung im negativen Modus wurde durch m/z 577,1358 $[M-H]^-$ ein Pseudomolekülion detektiert, welches auf ein einfach verknüpftes dimeres PA mit dihydroxyliertem B- und E-Ring schließen ließ. Aufgrund der gesamten Daten konnte die Verbindung S.d. S3.2 M4 R2 final als PC B2 (Epicatechin-(4 β →8)-epicatechin) verifiziert werden.

Tabelle 3-2: NMR-Tabelle zu PC B2 (freiphenolisch). Die NMR-Messungen wurden bei -40 °C mit einem AVANCE III HD NMR-Spektrometer (^1H -NMR: 400,13 MHz, ^{13}C -NMR: 100,63 MHz, in $\text{MeOH-}d_4$) durchgeführt.

	Pos.	$\delta_{\text{C, major}} + \delta_{\text{C, minor}}$, Typ	$\delta_{\text{H, major}}$ (J in Hz) + $\delta_{\text{H, minor}}$ (J in Hz)
obere Einheit	2	76.9, CH	5.05, bs + 5.41, s (H_2O -Signal)
	3	73.6, CH	3.78, d (2.0) + 3.87, bs
	4	36.6 + 37.5, CH	4.61, d (1.0) + 4.50, bs
	4a	102.0, C	
	5	157.9, C	
	6	95.6, CH	5.92, d (2.4)
	7	157.8, C	
	8	95.6, CH	5.94, d (2.4)
	8a	157.9, C	
	1 *	132.5, C	
	2 *	114.9, CH	6.83
	3 *	145.8, C	
	4 *	145.4, C	
	5 *	115.6, CH	6.67, d (8.2)
	6 *	119.0, CH	6.60, dd (8.2, 1.8)
untere Einheit	2	79.4, CH	4.95, bs + 4.38, bs
	3	67.1 + 67.4, CH	4.24, m + 3.92, m
	4	30.0 + 29.6, CH_2	2.79, d (16.6) + 2.67, dd (17.0, 1.8) 2.94, dd (16.5, 4.2) + 2.84, dd (17.4, 5.3)
	4a	99.6, C	
	5	156.6, C	
	6	96.7 + 95.4, CH	5.87, s + 6.06, s
	7	156.7, C	
	8	107.2, C	
	8a	154.5, C	
	1 *	132.1, C	
	2 *	114.8, CH	7.09, d (1.7)
	3 *	145.9, C	
	4 *	145.4, C	
	5 *	115.6, CH	6.71, d (8.2)
	6 *	118.7, CH	6.84, dd (1.7, 9.9)

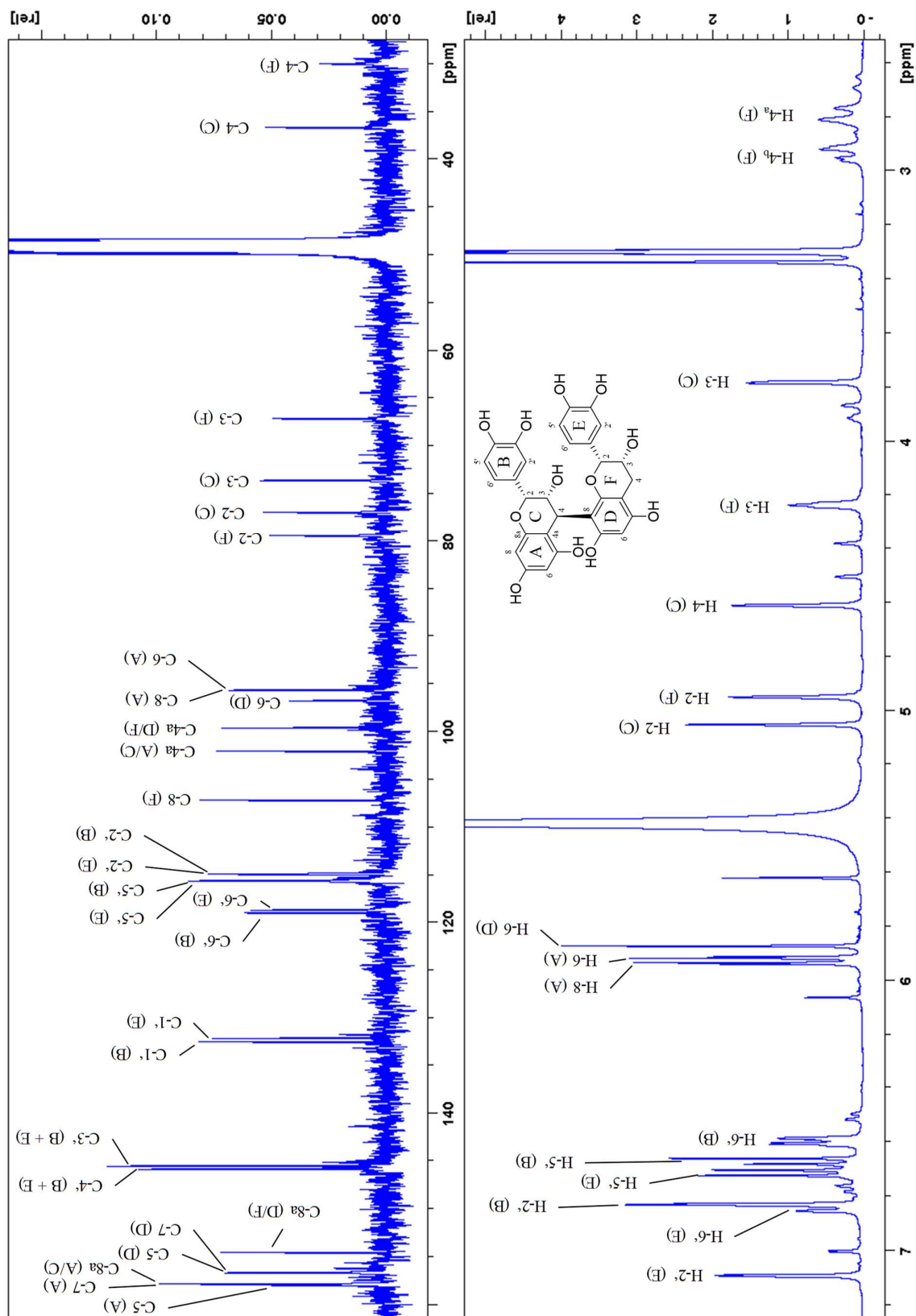


Abb. 3-8: ^{13}C - und ^1H -NMR-Spektrum von PC B2 (S.d. S3.2 M4 R2) gelöst in $\text{MeOH-}d_4$ bei -40°C , AVANCE III HD 400,13 MHz (^1H -NMR) und 100,63 MHz (^{13}C -NMR).

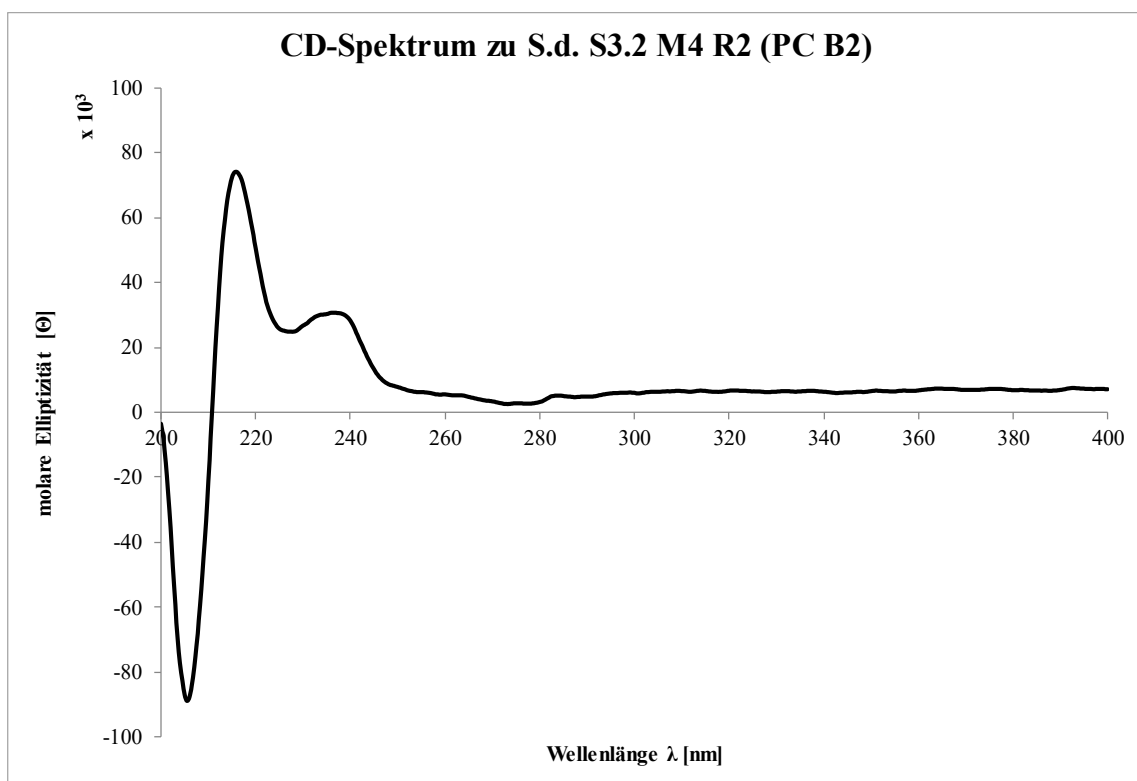
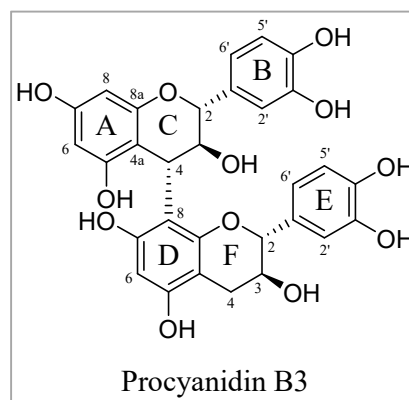


Abb. 3-9: CD-Spektrum zur Verbindung S.d. S3.2 M4 R2, bzw. PC B2. CD (MeOH, Θ) 205.5 (-88801.9), 216 (+74024.2), 236.5 (+30663.3), 273.5 (+2531.16).

3.2.4 Procyanidin B3

Diese Verbindung eluierte mit Fraktion S.d. S.3.2 zwischen 2200 und 2986 mL von der Sephadex® LH-20 Säule (vgl. Kapitel 3.6.4). Beim nächsten Fraktionierungsschritt an MCI-Gel® CHP20P wurde diese Substanz zwischen 682 und 1008 mL in Fraktion S.d. S3.2 M2 detektiert (vgl. Kapitel 3.6.5). Die finale Aufreinigung fand an einer präparativen HPLC mit dem HPLC-System A statt. Dabei wurde diese Verbindung bei $R_t = 13,3$ min UV-metrisch erfasst (S.d. S3.2 M2 R2, vgl. Kapitel 3.6.6). Die Ausbeute betrug nach Lyophilisation 45,8 mg.



Im Unterschied zu den bereits beschriebenen PC B1 (vgl. Kapitel 3.2.2) und PC B2 (vgl. Kapitel 3.2.3) konnten hier bereits bei RT auswertbare NMR-Signale erhalten werden. Die entsprechenden ^1H - und ^{13}C -NMR-Signale sind in **Tabelle 3-3** und **Abb. 3-11** der jeweiligen Position im Molekül zugeordnet. Die Kopplungskonstanten von H-2 und H-3 (Obere Einheit: $J = 9.7$ Hz; Untere Einheit: $J = 7.3$ Hz) zeigen eine 2,3-*trans* Konfiguration in beiden monomeren Einheiten an. Die erhaltenen NMR-Daten der freiphenolischen Verbindung stimmen mit den Literaturdaten überein (Mohri et al., 2007; Saito et al., 2002). Allerdings erfolgte in beiden aufgeführten Arbeiten keine Zuordnung der Signale. Damit wurde diese Lücke durch die vorliegende Arbeit geschlossen. Soweit eindeutig bestimmbar wurden auch die Signale des Rotationsisomers aufgeführt, die sich durch ein kleineres Integral auszeichneten. Wie bei PC B1 (vgl. Kapitel 3.2.2) wurde auch hier ein Aliquot von 9,5 mg peracetyliert. Diese Reaktion resultierte in 14,7 mg peracetyliertem PC B3, was einer Ausbeute von 89,6% entspricht. Durch diese Derivatisierung konnte die Rotation in dieser Verbindung durch eine sterische Hinderung erfolgreich unterbunden werden. Damit waren die Minorsignale der freiphenolischen Substanz als die Signale eines energetisch weniger günstigen Rotationsisomers bewiesen. Das zugehörige ^1H -NMR-Spektrum ist in **Abb. 3-10** gezeigt. Dieses Spektrum stimmt auch mit den Daten bei Kolodziej (1986) überein. Wie bereits schon vorher beschrieben, wurden die Ergebnisse des CD für die Bestimmung der Konfiguration an C-4 (C-Ring) herangezogen (siehe PC B1: Kapitel 3.2.2). Dabei zeigten die negativen Cotton-Effekte zwischen 220-240 nm eine α -Konfiguration an C-4 des C-Rings an und diese Daten stimmen mit denen von Barrett et al. (1979) überein. Das zugehörige CD-Spektrum ist in **Abb. 3-12** abgebildet. Die absolute Stereochemie wurde durch die Bestimmung eines $[\alpha]_{589}^{23}$ von -180,1 (0,1; MeOH) belegt. Dieser Wert stimmt mit dem von Mohri et al. (2007) veröffentlichtem spezifischen Drehwert überein. Die ESI-HRMS Messung

im negativen Modus lieferte ein Fragment mit m/z 577,1369 $[M-H]^-$, welches ein einfach verknüpftes dimeres PA mit dihydroxyliertem B- und E-Ring vermuten ließ. Durch den gesamten Datensatz wurde die Verbindung S.d. S3.2 M2 R2 final als PC B3 (Catechin-(4 α →8)-catechin) bestätigt.

Die im Gegensatz zu PC B1 und PC B2 bereits bei RT eingeschränkte Rotationsisomerie könnte auf eine intramolekulare Stabilisierung zurückzuführen sein. Die hier vorliegende α -Konfiguration des C-4 (C-Ring) resultiert im Gegensatz zur β -Konfiguration in einer kompakteren Molekülfaltung. Die 3D-Modelle von PC B1 und BC B3 sind in **Abb. 3-13** abgebildet. Dabei fällt auf, dass sich der B- und E-Ring im Falle der 4 α -Konfiguration bei einer Drehung um die (4 α →8)-Bindung gegenseitig sterisch blockieren. Außerdem können in diesem Fall auch noch H-Brücken zwischen der oberen und der unteren Einheit diskutiert werden, die aufgrund der räumlichen Nähe denkbar wären. Im Falle der 4 β -Konfiguration kann hingegen eine ungehinderte Rotation um die (4 β →8)-Bindung erfolgen. Um diese These weiter zu stützen, wurden die Energiediagramme für die beiden hier diskutierten Verbindungen unter zu Hilfenahme des „Dihedral Drivers“ (Chem3D, PerkinElmer, Rodgau, Deutschland) während einer 360°-Drehung um die (4→8)-Bindung errechnet (siehe **Abb. 3-14**). Hierbei handelt es sich um ein stark vereinfachtes Verfahren, zumal bei dieser Herangehensweise lediglich die Ausgangsverbindung über einen MM2-Algorithmus optimiert wurde. Eine energetische Optimierung müsste eigentlich während der gesamten Rotation vorgenommen werden, um präzisere Ergebnisse zu generieren. Für eine solche Rechenoperation stand jedoch nicht die nötige Rechenleistung zur Verfügung. Dennoch können die hier erstellten Diagramme die bereits ausgeführten Hypothesen stützen, zumal im Falle des PC B3 viel engere Bereiche für energetisch günstige Konformere zur Verfügung stehen als bei PC B1.

Tabelle 3-3: NMR-Tabelle zu PC B3 (freiphenolisch). Die NMR-Messungen wurden bei RT mit einem AVANCE III 600 NMR-Spektrometer mit 5 mm TCI CryoProbe (^1H -NMR: 600,25 MHz, ^{13}C -NMR: 150,95 MHz, in $\text{MeOH-}d_4$) durchgeführt.

	Pos.	$\delta_{\text{C, major}} + \delta_{\text{C, minor}}$, Typ	$\delta_{\text{H, major}}$ (J in Hz) + $\delta_{\text{H, minor}}$ (J in Hz)
obere Einheit	2	84.0 + 84.1, CH	4.25, d (9.7) + 4.35, d (9.1)
	3	73.7 ^a + 73.7 ^a , CH	4.35, dd (9.7, 8.0) + 4.51, d (9.1)
	4	38.6 + 38.5, CH	4.40, d (7.9) + 4.49, d (8.0)
	4a	107.2 + 107.1, C	
	5	157.1 ^b , C	
	6	97.3 + 97.5, C	5.88, d (2.4) + 5.80, d (2.3)
	7	157.1 ^b + 157.3, C	
	8	96.9 + 96.2, CH	5.78, d (2.4) + 5.83, d (2.4)
	8a	158.6, C	
	1 ^c	132.6 + 132.4, C	
	2 ^c	116.4 + 116.2 ^c , CH	6.73, d (1.9) + 6.95, d (1.9)
	3 ^c	145.6 + 146.1 ^d , C	
	4 ^c	146.1 + 146.1, C	
	5 ^c	116.2 + 115.9, CH	6.66, d (8.1) + 6.76, d (8.0)
	6 ^c	120.6 + 121.0, CH	6.46, dd (8.2, 1.9) + 6.81 ^e , dd (8.0, 1.9)
untere Einheit	2	82.5 + 82.9, CH	4.53, d (7.3) + 4.74, d (7.3)
	3	68.9 + 68.6, CH	3.78, m + 4.06, m
	4	28.8 + 28.5, CH ₂	2.48, dd (16.2, 8.0) + 2.58, dd (16.1, 7.7) 2.75, dd (16.3, 5.5) + 2.81, dd (16.2, 5.4)
	4a	102.2 + 100.5, C	
	5	155.9 + 155.8, C	
	6	96.1 + 97.5, C	6.06, s + 5.93, s
	7	155.7, C	
	8	108.2 + 108.3, C	
	8a	154.9 + 155.0, C	
	1 ^c	131.8 + 132.2, C	
	2 ^c	115.5 + 115.2, CH	6.58, d (1.9) + 6.95, d (1.9)
	3 ^c	145.5 + 146.1 ^d , C	
	4 ^c	145.8 + 146.1 ^d , C	
	5 ^c	116.1 + 116.1 ^c , C	6.67, d (8.2) + 6.75, d (8.2)
	6 ^c	119.9 + 120.2, C	6.25, dd (8.2, 1.9) + 6.82 ^e , dd (8.2, 1.8)

^{a-c} Signale mit den gleichen Buchstaben überlappen

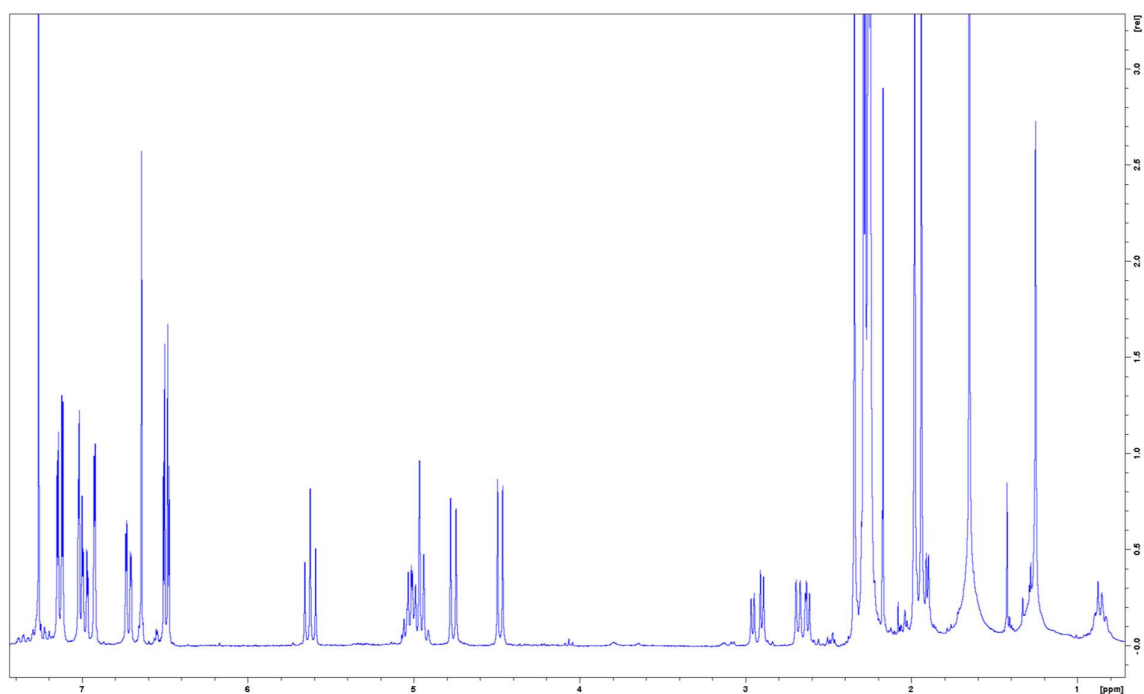


Abb. 3-10: ^1H -NMR-Spektrum des peracetylierten PC B3 gelöst in Chloroform- d_1 bei RT, AVANCE 300 (300,13 MHz).

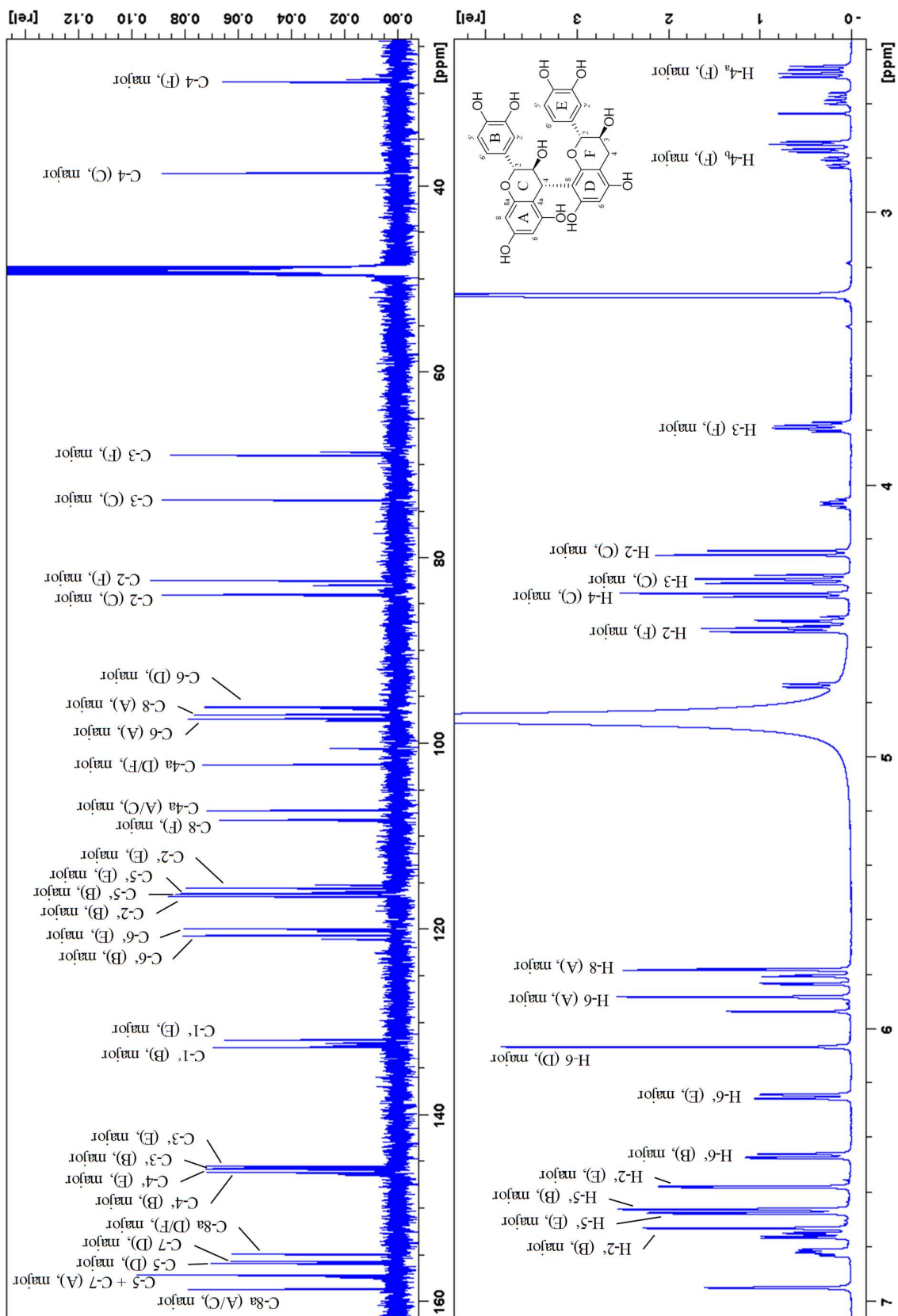


Abb. 3-11: ^{13}C - und ^1H -NMR-Spektrum von PC B3 (S.d. S3.2 M2 R2) gelöst in $\text{MeOH-}d_4$ bei RT, AVANCE III 600 mit 5 mm TCI CryoProbe 600,25 MHz (^1H -NMR) und 150,95 MHz (^{13}C -NMR).

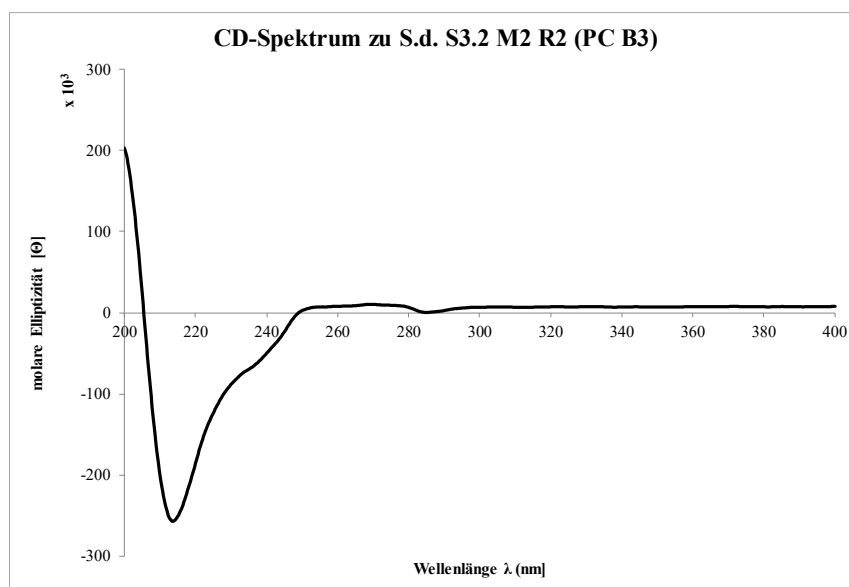


Abb. 3-12: CD-Spektrum zur Verbindung S.d. S3.2 M2 R2, bzw. PC B3. CD (MeOH, Θ) 213.5, (-256750.0), 236 (-66990.6), 269.5 (+9984.63), 285 (+142.118).



Abb. 3-13: Die 3D-Modelle von PC B1 (links) und PC B3 (rechts). Die Modelle wurden in Chem3D erzeugt und über den MM2-Algorithmus energetisch optimiert. Die grauen Elemente beschreiben das Kohlenstoffgerüst, die roten Elemente die Sauerstoffatome und die weißen Elemente die Protonen. Die jeweilige (4→8)-Bindung ist durch den gelben Pfeil markiert.

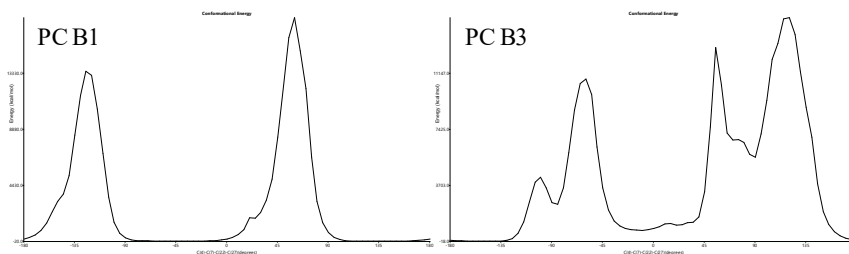
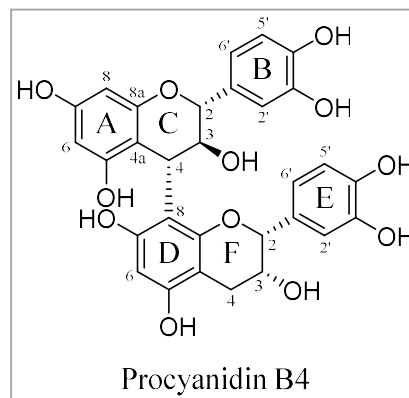


Abb. 3-14: Energiediagramme bei einer Drehung von 360° um die (4→8)-Bindung bei PC B1 (links) und PC B3 (rechts).

3.2.5 Procyanidin B4

Diese Verbindung eluierte in Fraktion S.d. S3.2 zwischen 2200 - 2986 mL von der Sephadex® LH-20 Säule (vgl. Kapitel 3.6.4). Beim nächsten Fraktionierungsschritt an MCI-Gel® CHP20P wurde sie zwischen 1147 - 1488 mL in Fraktion S.d. S3.2 M4 detektiert (vgl. Kapitel 3.6.5). Die finale Aufreinigung fand an einer präparativen HPLC mit dem HPLC-System B statt. Dabei wurde diese Verbindung bei $R_t = 11,6$ min (Lauf 1) und $R_t = 13,2$ min (Lauf 2) UV-metrisch erfasst (S.d. S3.2 M4 R1, vgl. Ka-



pitel 3.6.6). Obwohl die R_t s der Peaks in den beiden Läufen abwichen, konnte über die Elutionsreihenfolge eine eindeutige Zuordnung erfolgen. Die Ausbeute betrug nach Lyophilisation 7,4 mg.

Die spektroskopischen Daten zeigen für die isolierte Substanz Übereinstimmung mit Saito et al. (2003) und Mohri et al. (2007). Jedoch wurden in beiden Veröffentlichungen die NMR-Signale nicht den jeweiligen Positionen im Molekül zugeordnet wie dies in der hier vorliegenden Arbeit vorgenommen wurde. Ebenfalls wurden hier ebenfalls die Minorsignale des Rotationsisomers berücksichtigt, soweit es eindeutig zuzuordnen war. Wie bereits exemplarisch für PC B3 diskutiert, konnten auch für diese Verbindung auswertbare NMR-Spektren bei RT erzeugt werden. Die großen Kopplungskonstanten von $J = 9.7$ Hz (H-2, C-Ring) und $J = 8.0$ Hz (F-Ring) lassen auf eine 2,3-*trans*-Konfiguration in der oberen Einheit schließen. Die Kopplungskonstanten konnten hier nicht präzise ermittelt werden, da die detektierten Signale aufgrund der geringen Menge keine definierten Spitzen aufwiesen. Vor allem das bs des H-2-Signals der unteren Einheit deutet auf eine 2,3-*cis*-Konfiguration dieser Einheit hin. Die α -Konfiguration an C-4 wurde wieder über die negativen Cotton-Effekte zwischen 220-240 nm im CD-Spektrum bewiesen, die mit denen von Barrett et al. (1979) kongruent waren. Der Datensatz bzgl. der absoluten Stereochemie wurde hier über die Polarimetrie vervollständigt. Dabei wurde ein $[\alpha]_{589}^{23}$ von -180,1 (0,1; MeOH) ermittelt, der sich in einem übereinstimmenden Bereich mit bisher publizierten Daten findet (Mohri et al., 2007; Saito et al., 2003). Abschließend wurde über eine ESI-HRMS Messung ein Fragment mit m/z 577,1364 $[M-H]^-$ detektiert, welches auf ein einfach verknüpftes dimeres Flavan-3-ol mit dihydroxyliertem B- und E-Ring schließen ließ. Damit konnten über die gesamten Daten die Verbindung S.d. S3.2 M4 R1 als PC B4 (Catechin-(4 α →8)-epicatechin) identifiziert werden.

Tabelle 3-4: NMR-Tabelle zu PC B4 (freiphenolisch). Die NMR-Messungen wurden bei RT mit einem AVANCE III 600 NMR-Spektroskop mit 5 mm TCI CryoProbe (^1H -NMR: 600,25 MHz, ^{13}C -NMR: 150,95 MHz, in $\text{MeOH}-d_4$) durchgeführt.

	Pos.	$\delta_{\text{C, major}} + \delta_{\text{C, minor}}$, Typ	$\delta_{\text{H, major}}$ (J in Hz) + $\delta_{\text{H, minor}}$ (J in Hz)
obere Einheit	2	83.9 + 84.1, CH	4.41, d (9.7) + 4.31 ⁱ , m*
	3	73.8 + 73.8, CH	4.56, d (8.0) + 4.31 ⁱ , m*
	4	38.9 + 38.8, CH	4.62, d (7.9) + 4.46, d (7.1)
	4a	107.2 + 107.4, C	
	5	157.5 + 157.2, C	
	6	97.6 + 97.7, CH	5.79, d (2.1) + 5.89, d (2.1)
	7	157.3 + 157.3, C	
	8	96.1 + 97.1, CH	5.83, d (2.3) + 5.93, d (2.2)
	8a	158.7 + 158.6, C	
	1 ^c	132.2 + 132.6, C	
	2 ^c	116.3 + 116.4, CH	6.98, d (1.9) + 6.69, d (1.9)
	3 ^c	146.5 + 145.6, C	
	4 ^c	146.0 + 146.1, C	
untere Einheit	5 ^c	116.0 ^f + 116.1 ^f , CH	6.79 ^j , d (7.7) + 6.60, d (8.2)
	6 ^c	121.2 + 120.5, CH	6.86 ^k , d (8.0) + 6.41, dd (8.2, 1.8)
	2	80.0 + 79.9, CH	4.93, bs + 4.80, bs
	3	67.4 + 67.8, CH	4.22, m + 4.05, m
	4	30.1 + 29.4, CH ₂	2.82, dd (16.9, 1.7) + 2.70, dd (17.1, 2.3) 2.92, dd (16.8, 4.4) + 2.86, dd (17.0, 5.0)
	4a	99.4 + 101.5, C	
	5	156.4 + 156.3, C	
	6	97.5 + 96.4, CH	5.95, s + 6.09, s
	7	155.9 ^g + 155.9 ^g , C	
	8	108.7 + 108.3, C	
	8a	155.4 ^h + 155.4 ^h , C	
	1 ^c	132.4 + 131.7, C	
	2 ^c	115.3 + 114.8, CH	7.08, d (1.6) + 6.67, d (1.8)
	3 ^c	146.2 + 145.6, C	
	4 ^c	145.7 + 145.6, C	
	5 ^c	116.1 + 115.9, CH	6.77 ^j , d (8.2) + 6.71, d (8.2)
	6 ^c	119.1 + 120.3, CH	6.86 ^k , d (8.0) + 6.44, dd (8.2, 1.8)

^{f-k} Signale mit den gleichen Buchstaben überlappen

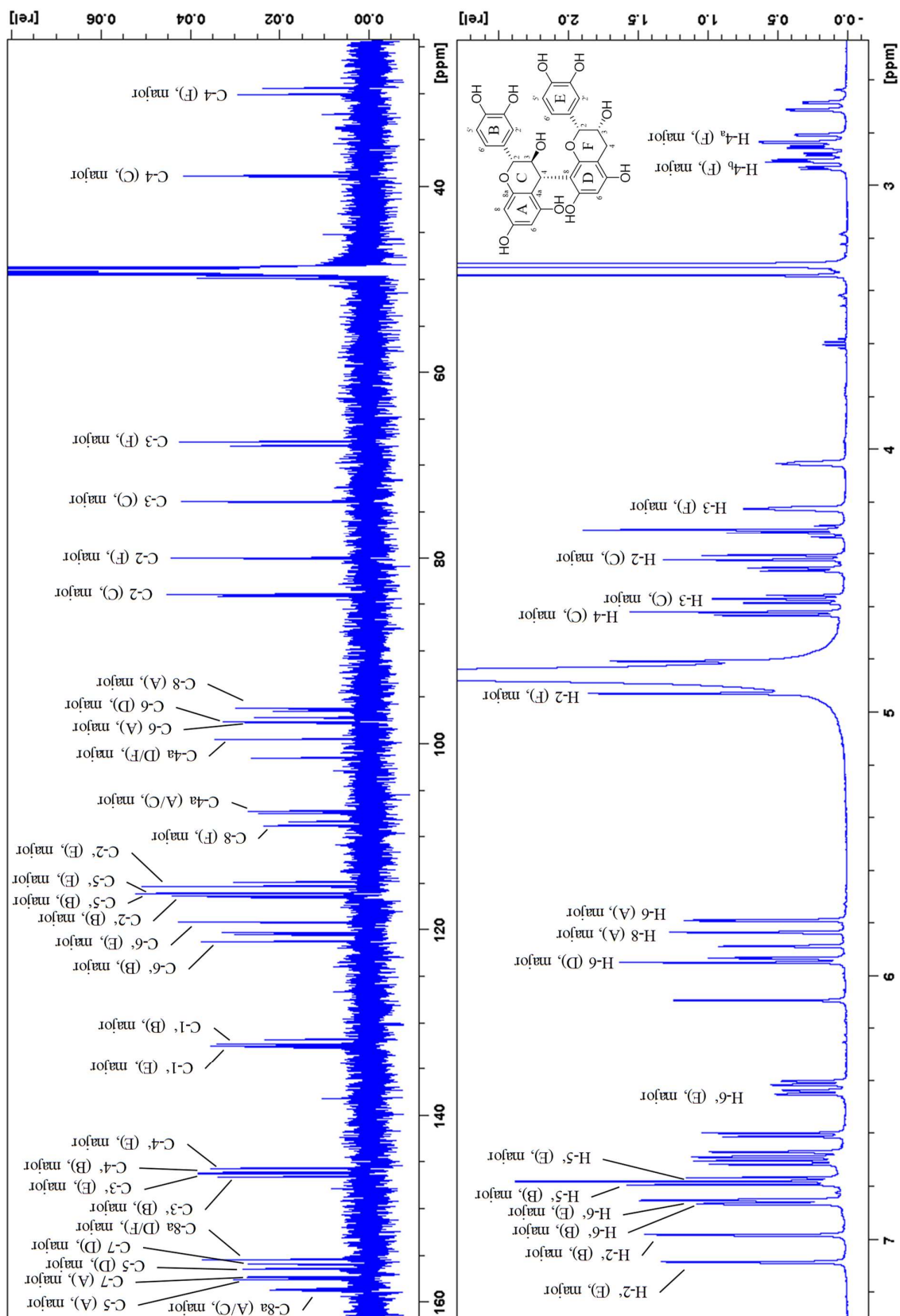


Abb. 3-15: ¹³C- und ¹H-NMR-Spektrum zu PC B4 (S.d. S3.2 M4 R1) gelöst in MeOH-*d*₄ bei RT. AVANCE III 600 mit 5 mm TCI CryoProbe 600,25 MHz (¹H-NMR) und 150,95 MHz (¹³C-NMR).

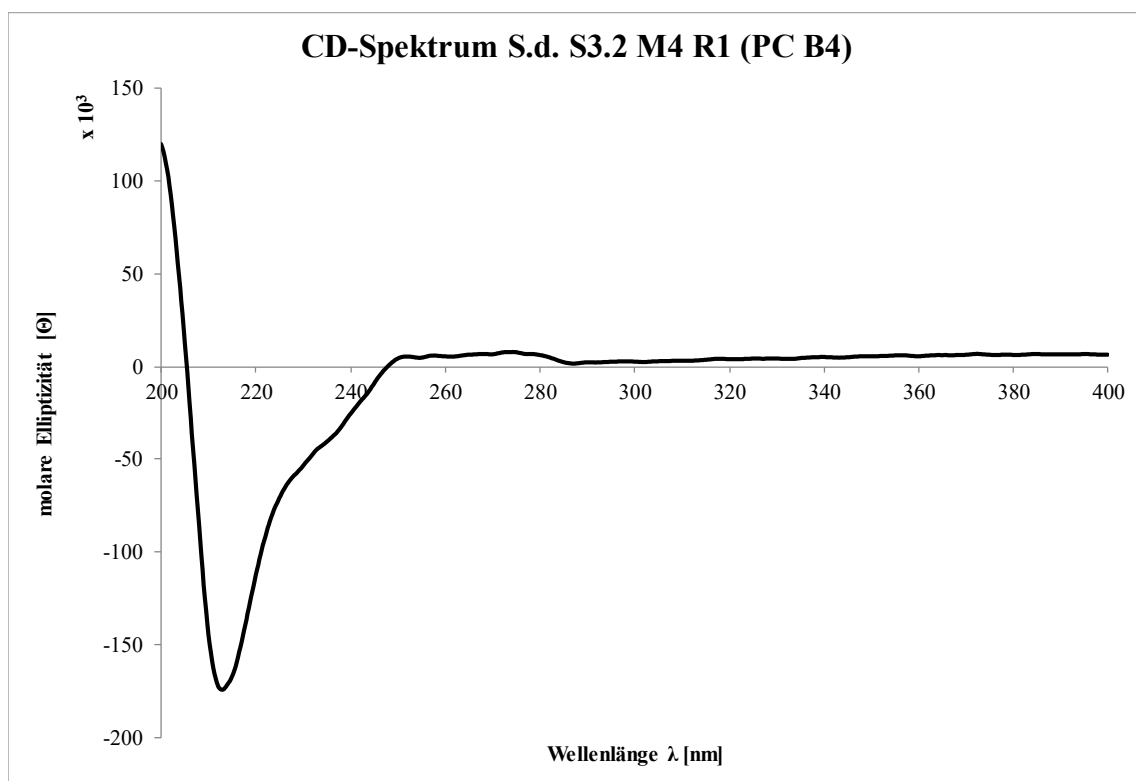
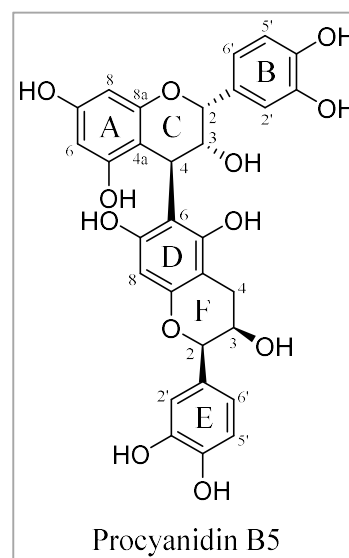


Abb. 3-16: CD-Spektrum zur Verbindung S.d. S3.2 M4 R1, bzw. PC B4. CD (MeOH, Θ) 213 (-173964.0), 236 (-38178.2), 252 (+5365.08), 274 (+7867.0).

3.2.6 Procyanidin B5

Diese Verbindung eluierte in Fraktion S.d. S3.3 zwischen 2986 - 4154 mL von der Sephadex® LH-20 Säule (vgl. Kapitel 3.6.4). Beim nächsten Fraktionierungsschritt an MCI-Gel® CHP20P wurde diese Substanz zwischen 2279 - 2538 mL in Fraktion S.d. S3.3 M7 detektiert (Kapitel 3.6.5). Die finale Aufreinigung fand an der präparativen HPLC mit dem HPLC-System D statt. Dabei wurde diese Verbindung bei $R_t = 9,1$ min UV-metrisch erfasst (S.d. S3.3 M7 D1, vgl. Kapitel 3.6.6). Da sie im ersten Aufreinigungsschritt nicht ausreichend von S.d. S3.3 M7 D2 getrennt war, erfolgte abschließend eine Endaufreinigung dieser Verbindung mit dem HPLC-System D. Die Ausbeute betrug nach Lyophilisation 1,4 mg.



In **Tabelle 3-5** und **Abb. 3-17** sind die Signale soweit möglich den jeweiligen Positionen im Molekül zugeordnet. An dieser Stelle ist nur das ^1H -NMR-Spektrum abgebildet, da das ^{13}C -Spektrum nicht auswertbar war, was auf die sehr geringe Substanzmenge zurückzuführen ist. Die angegebenen chemischen Verschiebungen für die Kohlenstoffe konnten über die 2D-NMR-Experimente (HSQC, HMBC) ermittelt werden. Auffällig war das Fehlen eines s im ^1H -NMR-Spektrum für H-8 (D-Ring). Da die ESI-HRMS Messung im negativen Modus für dieses Molekül ein m/z 577,1344 $[\text{M-H}]^-$ ergab, deutete dies auf ein einfach verknüpftes dimeres Flavan-3-ol mit dihydroxyliertem B- und E-Ring hin. Die bs-Signale von H-2 im C- und F-Ring lassen auf zwei 2,3-*cis*-konfigurierte Monomere schließen. In **Abb. 3-18** ist das CD-Spektrum zu dieser Substanz abgebildet. Dabei deuten die positiven Cotton-Effekte auf eine β -Konfiguration des C-4 der oberen Einheit hin (Barrett et al., 1979; Esatbeyoglu et al., 2011). Um die Struktur final zu verifizieren, wurde das gesamte Isolat peracetyliert, da lediglich 1,4 mg vorhanden waren. Durch diese Reaktion ergaben sich 1,5 mg Produkt, was einer Ausbeute von 60% entspricht. Das ^1H -NMR-Spektrum dieses Peracetats zeigte Übereinstimmung mit den Literaturdaten (Kolodziej, 1986; Kolodziej, 1980). Die Polarimetrie ergab ein $[\alpha]_{589}^{23} +13,7$ (0,1; Aceton) des Peracetats. Eine strukturbasierte Literaturrecherche (SciFinder®) konnte keinen bereits beschriebenen spezifischen Drehwert für dieses Peracetat zu Tage fördern. Nach abschließender Betrachtung der Ergebnisse wurde die Substanz S.d. S3.3 M7 D1 als PC B5 identifiziert.

Abschließend sei hier noch angemerkt, dass hier bereits bei RT auswertbare NMR-Spektren generiert werden konnten. Dazu wird später in Kapitel 3.2.7 am Beispiel von PC B7 ein Erklärungsversuch unternommen, der analog auch auf PC B5 angewendet werden kann.

Tabelle 3-5: NMR-Tabelle zu PC B5 (freiphenolisch). Die NMR-Messungen wurden bei RT mit einem AVANCE III 600 NMR-Spektroskop mit 5 mm TCI CryoProbe (^1H -NMR: 600,25 MHz, ^{13}C -NMR: 150,95 MHz, in $\text{MeOH-}d_4$) gelöst durchgeführt.

	Pos.	δ_{C} , Typ	δ_{H} (J in Hz)
obere Einheit	2	77.5, CH	4.91, bs
	3	72.9, CH	4.01, bs
	4	37.8, CH	4.56, d (1.2)
	4a	99.8, C	
	5	159.7, C	
	6	96.9, CH	5.98, d (2.0)
	7	?, C	
	8	96.2, CH	6.05, d (2.0)
	8a	158.2, C	
	1'	132.6, C	
	2'	115.3, CH	6.88, d (2.0)
	3'	145.9 – 146.1, C	
	4'	145.9 – 146.1, C	
	5'	116.0, CH	6.72, d (8.3)
	6'	119.3, CH	6.67, dd (8.1, 1.9)
untere Einheit	2	79.9, CH	4.80, bs
	3	67.7, CH	4.15, m
	4	29.7, CH ₂	2.68, m
	4a	?, C	2.83, m
	5	156.3, C	
	6	108.6, C	
	7	156.3, C	
	8	?, CH	?
	8a	?, C	
	1'	132.6, C	
	2'	115.5, CH	6.97, d (2.0)
	3'	145.9 – 146.1, C	
	4'	145.9 – 146.1, C	
	5'	116.0, CH	6.75, d (8.2)
	6'	119.6, CH	6.80, dd (8.1, 2.1)

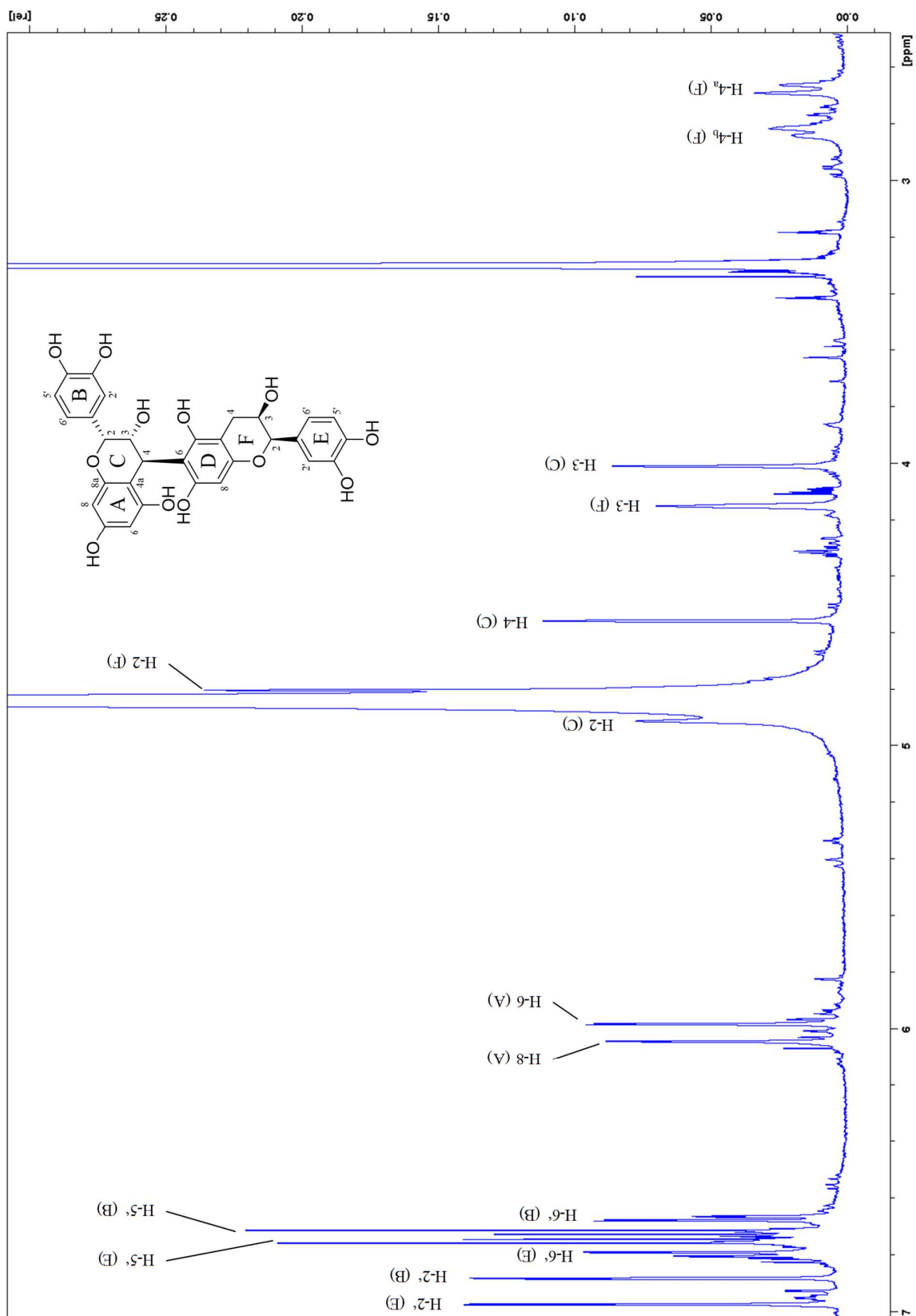


Abb. 3-17: ^1H -NMR-Spektrum von PC B5 (S.d. S3.3 M7 D1) gelöst in $\text{MeOH-}d_4$ bei RT, AVANCE III 600 mit 5 mm TCI CryoProbe 600,25 MHz (^1H -NMR).

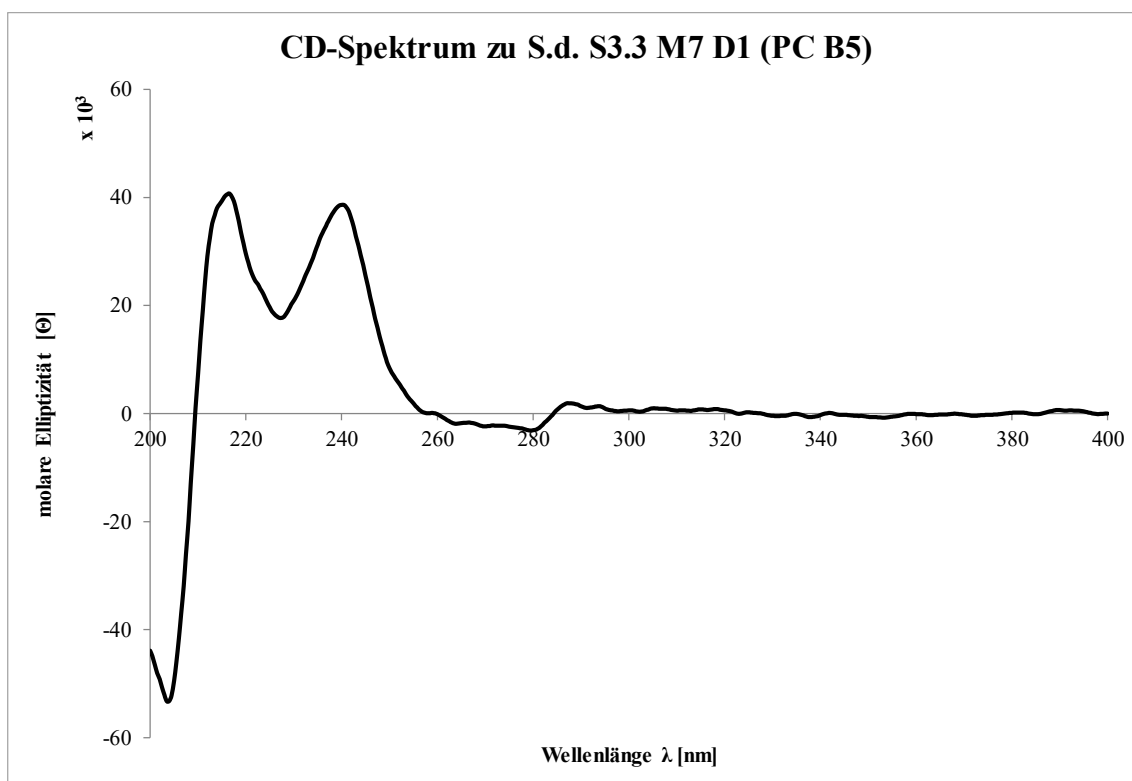


Abb. 3-18: CD-Spektrum zur Verbindung S.d. S3.3 M7 D1, bzw. PC B5. CD (MeOH, Θ) 203,5 (-53262,2), 216,5 (+40667,9), 227,5 (+17633,3), 240 (+38551,6), 279,5 (-3174,3), 287,5 (+1878,9).

3.2.7 Procyanidin B7

Diese Verbindung eluierte in Fraktion S.d. S3.3 zwischen 2986 - 4154 mL von der Sephadex® LH-20 Säule (vgl. Kapitel 3.6.4). Beim nächsten Fraktionierungsschritt an MCI-Gel® CHP20P wurde diese Substanz zwischen 1705 - 2015 mL in Fraktion S.d. S3.3 M5 detektiert (vgl. Kapitel 3.6.5). Die finale Aufreinigung fand an einer präparativen HPLC mit dem HPLC-System C statt. Dabei wurde diese Verbindung bei $R_t = 9,5$ min UV-metrisch erfasst (S.d. S3.3 M5 D1, vgl. Kapitel 3.6.6). Die Ausbeute betrug nach Lyophilisation 13,7 mg.

In **Tabelle 3-6** und **Abb. 3-22** sind die NMR-Signale der jeweiligen Position im freiphenolischen PC B7 zugeordnet. Wie bereits bei PC B3 (vgl. Kapitel 3.2.4), PC B4 (vgl. Kapitel 3.2.5) und PC B5 (vgl. Kapitel 3.2.6) konnten auch bei dieser Verbindung bereits bei RT auswertbare NMR-Spektren erhalten werden, obwohl die obere Einheit aufgrund der bs für H-2 und H-3 (C-Ring) 2,3-*cis*-konfiguriert ist. Bisher wurden sterische Gründe, die das Aufnehmen auswertbarer NMR-Spektren ermöglichen, nur für 2,3-*trans* konfigurierte obere Einheiten diskutiert (vgl. Kapitel 3.2.4). Das 3D-Modell des PC B7 (vgl. **Abb. 3-19**) zeigt, dass aufgrund der räumlichen Nähe H-Brücken zwischen den Hydroxygruppen an C-3 und C-5 der oberen und C-5 und C-7 der unteren Einheit

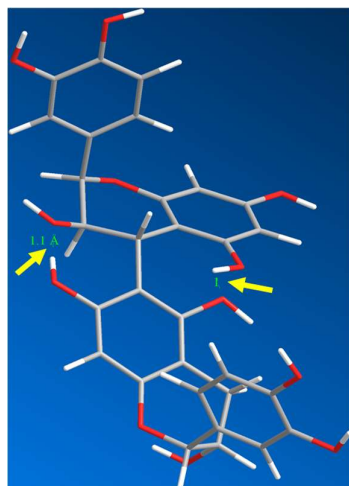
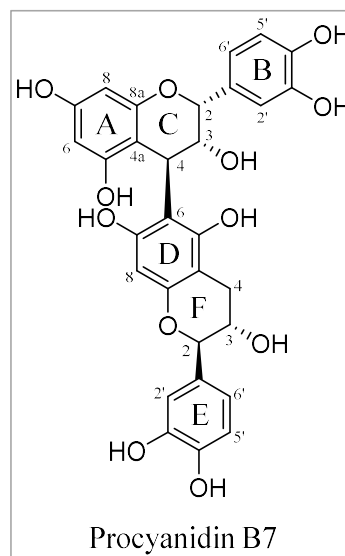


Abb. 3-19: 3D-Modell von PC B7. Die gelben Pfeile markieren die Bereiche in denen eine Stabilisierung über H-Brücken möglich wäre.

diskutiert werden können. Die untere Einheit sollte aufgrund der Kopplungskonstante des d des H-2 (D-Ring) von $J = 7.4$ Hz 2,3-*trans*-Konfiguriert sein. Weiter fällt auf, dass für das C-8 und H-8 (beide D-Ring) kein Signal detektiert wurde. Da die PCs in der Literatur überwiegend in Form ihrer Peracetate beschrieben wurden, sollte versucht werden, über eine Peracetylierung aufschlussreichere Informationen zu erhalten. Dazu wurde ein Aliquot von 5,1 mg umgesetzt. Durch diese Reaktion wurden 5,6 mg Produkt erhalten, was einer Ausbeute von 64% entspricht. Hier wurde das Edukt aber nicht komplett umgesetzt, sodass eine Aufreinigung mit dem HPLC-System F (vgl. Kapitel 3.6.6) nötig war, um ein sauberes ^1H -NMR-Spektrum zu erzeugen. Das entsprechende Produkt eluierte dabei bei 22,3 min mit einer Auswaage von 1,2 mg. Damit reduziert sich die Ausbeute nach dieser Aufreinigung auf lediglich 13,6%.

Wegen dieser geringen Menge war es nur möglich das ^1H -NMR-Spektren in auswertbarer Form zu generieren. Dabei konnten die Signale für die Protonen des A-Rings (H 6 und H-8) und des D-Rings (H-8) detektiert werden. In **Abb. 3-20** sind die entsprechenden Ausschnitte gezeigt. Es fällt auf, dass das bei 300 MHz aufgenommene Spektrum mit dem von Kolodziej (1980) und (1986) deckungsgleich ist. Jedoch wird durch die höhere Auflösung, gemessen am AVANCE III 600 NMR mit 5 mm TCI CryoProbe, die Aufspaltung der Signale deutlicher. Es muss daher diskutiert werden, ob die Zuordnungen, die durch Kolodziej vorgenommen wurden weiter standhalten können. Bei dem bei 600 MHz aufgenommenen ^1H -NMR-Spektrum löst sich der ehemals bei δ 6,74 ppm detektierte Signalcluster zu zwei d auf (δ 6,75 ppm, $J = 2.2$ Hz; δ 6.73 ppm, $J = 2.1$ Hz). Hier wird somit kein mögliches s für H-8 (D-Ring) in diesem Bereich sichtbar. Zwei weitere d werden bei δ 6.64 ppm ($J = 2.3$ Hz) und δ 6.58 ppm ($J = 2.2$ Hz) deutlich. Aufgrund der Kopplungskonstanten könnten diese d die Signale des AB-Systems (A-Ring) zweier Rotationsisomere darstellen. Die bs bei δ 6.61 ppm und δ 6.60 ppm wären demnach die Signale für H-8 (D-Ring) zweier Rotationsisomere. Um Gewissheit zu bekommen, müssten diese Hypothesen allerdings über einen vollständigen 2D-NMR-Datensatz belegt werden, der aufgrund der geringen Substanzmenge nicht realisierbar war. Der Nachweis der Verbindung S.d. S3.3 M5 D1 als PC B7 in Bezug auf die NMR-Daten des Peracetats sollte aber über die Aufnahme des ^1H -NMR-Spektrums bei 300,13 MHz gegeben sein, da auch die weiteren Signale Übereinstimmung zeigten. Die positiven Cotton-Effekte zwischen 220-240 nm der freiphenolischen Verbindung bestätigen auch hier die β -Konfiguration an C-4 (vgl. **Abb. 3-21**) (Esatbeyoglu et al., 2011). Die absolute Stereochemie wurde zusätzlich durch ein $[\alpha]_{589}^{24}$ von +65,9 (0,1; MeOH) gesichert. Eine strukturbasierte Literaturrecherche (SciFinder®) konnte keinen bisher beschriebenen Wert zu Tage fördern, der zu einem Abgleich herangezogen werden konnte. Die ESI-HRMS Messung mit m/z 577,1369 $[\text{M-H}]^-$ deutete auch in diesem Fall auf ein einfach verknüpftes dimeres Flavan-3-ol mit dihydroxyliertem B- und E-Ring hin. Durch den hier präsentierten Datensatz konnte die Struktur S.d. S3.3 M5 D1 als PC B7 (Epicatechin-(4 β →6)-catechin) belegt werden.

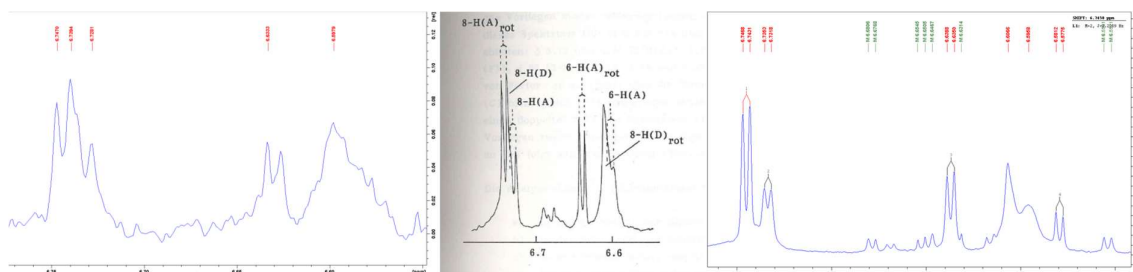


Abb. 3-20: Zeigt die Ausschnitte der ^1H -NMR-Spektren mit dem Bereich der Signale der Hs des A- und D-Rings der vorliegenden Verbindung. Links: ^1H -NMR-Spektrum des Peracetats der Verbindung S.d. S3.3 M5 D1 (CDCl_3 , RT, AVANCE 300: 300,13 MHz (^1H -NMR)). Mitte: ^1H -NMR-Spektrum des PC B7 aus der Dissertation von Herbert Kolodziej (1980) (CDCl_3 , 30 °C, NMR 300 MHz). Rechts: ^1H -NMR-Spektrum des Peracetats der Verbindung S.d. S3.3 M5 D1 (CDCl_3 , 30 °C, AVANCE III 600 mit 5 mm TCI CryoProbe: 600,25 MHz (^1H -NMR)). Bei der linken und rechten Abb. ist der Einfluss der Frequenz, bzw. der Stärke des Magnetfelds, des NMR-Spektrometers zu erkennen. Aufgrund dieser Erkenntnis müssen die Zuordnungen in der mittleren Abb. in Teilen angezweifelt werden (δ 6.70 – 6.80 ppm).

Tabelle 3-6: NMR-Tabelle zu PC B7 (freiphenolisch). Die NMR-Messungen wurden bei RT mit einem AVANCE III 600 NMR-Spektrometer mit 5 mm TCI CryoProbe (^1H -NMR: 600,25 MHz, ^{13}C -NMR: 150,95 MHz, in $\text{MeOH-}d_4$) durchgeführt.

	Pos.	δ_{C} , Typ	δ_{H} (J in Hz)
obere Einheit	2	77.3, CH	4.91, bs
	3	72.7, CH	4.01, bs
	4	37.7, CH	4.56, d (0.9)
	4a	99.7, C	
	5	159.4, C	
	6	96.8, CH	5.99, d (1.6)
	7	159.4, C	
	8	96.1, CH	6.05, d (1.9)
	8a	158.0, C	
	1'	132.3, C	
	2'	115.2, CH	6.89, d (1.8)
	3'	146.2, C	
	4'	145.7, C	
	5'	115.9, CH	6.73, d (8.0)
	6'	119.2, CH	6.69, dd (8.3, 1.8)
untere Einheit	2	82.6, CH	4.57, d (7.4)
	3	68.8, CH	3.96, m
	4	28.6, CH_2	2.46, dd (15.6, 7.7) 2.75, m
	4a	101.4, C	
	5	155.7, C	
	6	108.2, C	
	7	155.9, C	
	8	?	?
	8a	155.0, C	
	1'	132.2, C	
	2'	115.2, CH	6.84, d (1.9)
	3'	146.3, C	
	4'	146.0, C	
	5'	116.1, CH	6.75, d (8.1)
	6'	120.0, CH	6.72, dd (8.0, 2.3)

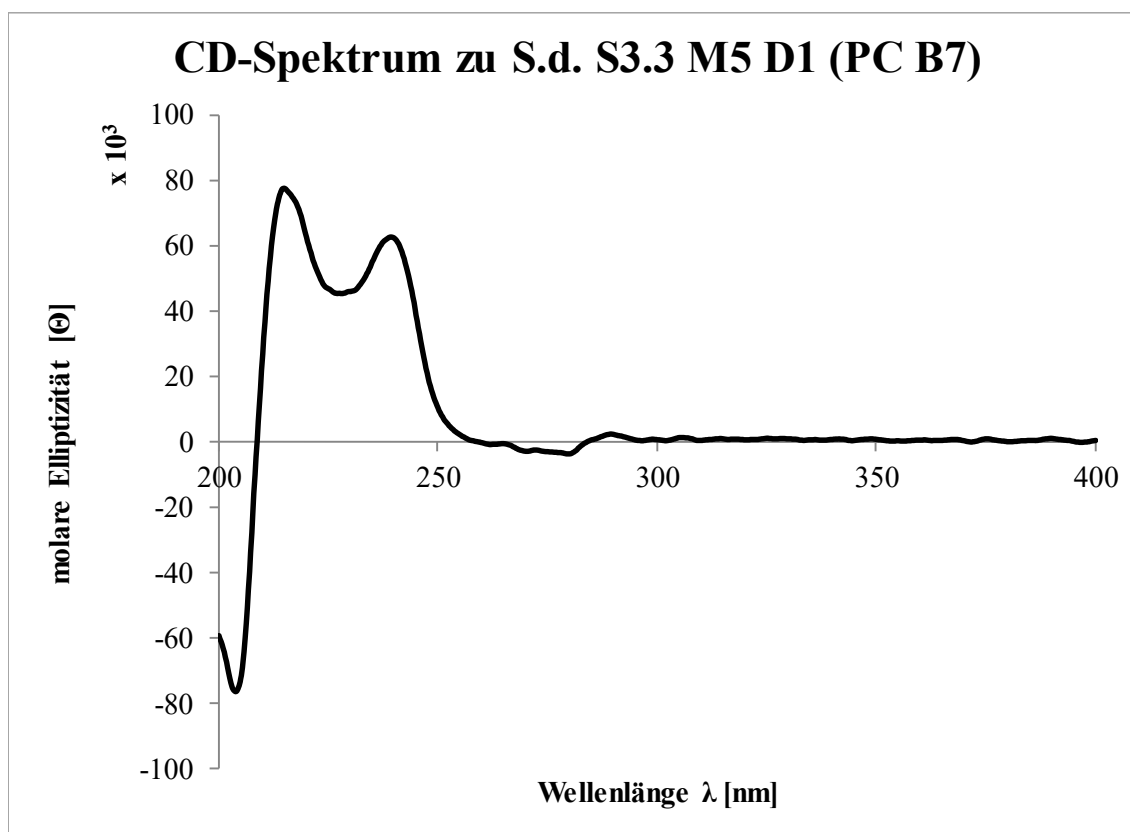


Abb. 3-21: CD-Spektrum zur Verbindung S.d. S3.3 M5 D1, bzw. PC B7. CD (MeOH, Θ) 204 (-79084,6), 215 (+77263), 228 (+45220,2), 239 (+62414,1), 279,5 (-3697,6), 289,5 (+2338,8).

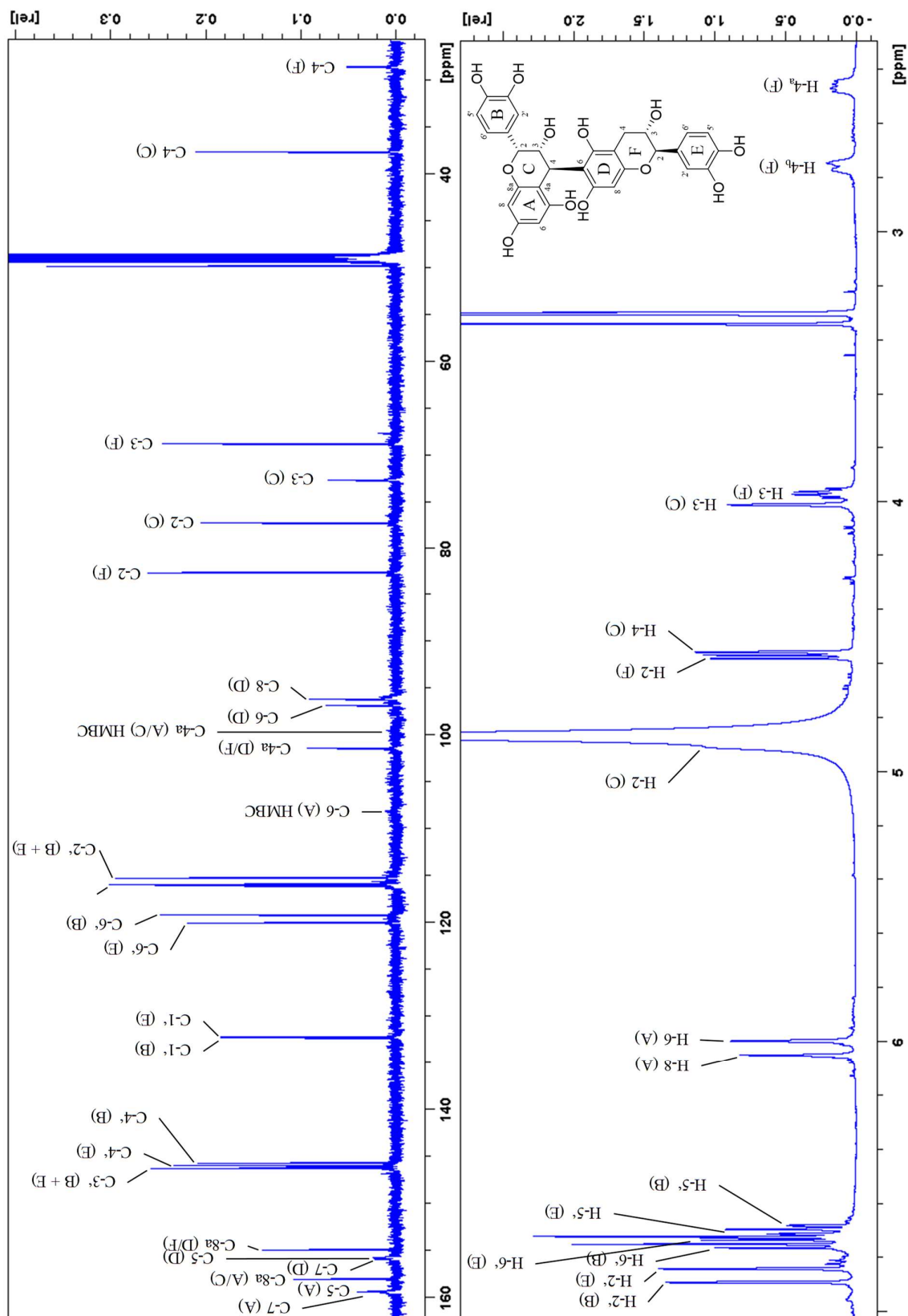
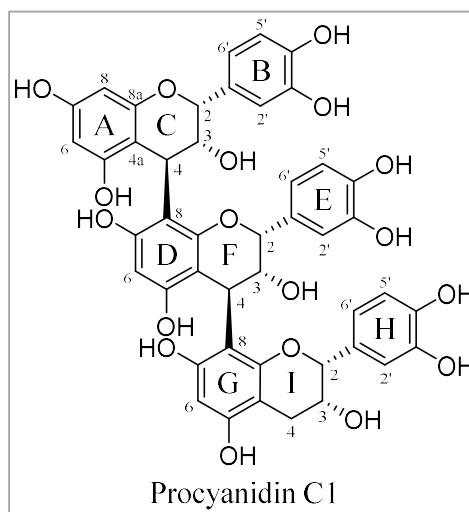


Abb. 3-22: ^{13}C - und ^1H -NMR-Spektrum von PC B7 (S.d. S3.3 M5 D1) in $\text{MeOH-}d_4$ gelöst bei RT, AVANCE III 600 mit 5 mm TCI CryoProbe 600,25 MHz (^1H -NMR) und 150,95 MHz (^{13}C -NMR).

3.2.8 *Procyanidin C1*

PC C1 eluierte in Fraktion S.d. S3.3 zwischen 2986 - 4154 mL von der Sephadex® LH-20 Säule (vgl. Kapitel 3.6.4). Beim nächsten Fraktionierungsschritt an MCI-Gel® CHP20P wurde diese Substanz zwischen 1364 - 1705 mL in Fraktion S.d. S3.3 M4 detektiert (vgl. Kapitel 3.6.5). Die finale Aufreinigung fand an einer präparativen HPLC mit dem HPLC-System C statt. Dabei wurde diese Verbindung bei $R_t = 7,3$ min UV-metrisch erfasst (S.d. S3.3 M4 D1, vgl. Kapitel 3.6.6). Die Ausbeute betrug nach Lyophilisation 8,7 mg.



In **Tabelle 3-7** und **Abb. 3-23** sind die jeweiligen NMR-Signale den Positionen im Molekül zugeordnet. Es ist hier nur das ^1H -NMR-Spektrum abgebildet (**Abb. 3-23**), da das 1D- ^{13}C -NMR-Spektrum nicht vollständig gemessen werden konnte. Daher erfolgte die Ermittlung der chemischen Verschiebungen für die ^{13}C -NMR-Signale zum Teil über die 2D-Experimente (HSQC und HMBC). Zur Absicherung der Struktur wurden zusätzlich zu den bestehenden NMR-Spektren bei -40 °C auch ein ^1H -NMR-Spektrum bei -20 °C aufgenommen. Damit konnte durch einen Abgleich der Ergebnisse mit den Daten von Shoji et al. (2003) der Nachweis zum Vorliegen von PC C1 geführt werden. Jedoch muss für das Signal bei $\delta\ 7.02$ ppm (H-2', E-Ring), die von Shoji et al. (2003) mit $J = 8$ Hz angegebene Kopplungskonstante korrigiert werden. Im vorliegenden Datensatz wurde für das entsprechende Signal ein typischer Wert für eine aromatische *meta*-Kopplung mit $J = 1.6$ Hz ermittelt. Die sehr kleinen Kopplungskonstanten mit $J \leq 2.1$ Hz, die vor allem bei den H-2 in jeder Einheit ermittelt werden konnten, lassen auf eine 2,3-*cis*-Konfiguration in allen drei Monomeren schließen. Der vollständige NMR-Datensatz bei -40 °C wurde in diesem Projekt das erste Mal erarbeitet. Die absolute Stereochemie wurde über Abgleich der CD-Daten (vgl. **Abb. 3-24**) mit der Literatur (Barrett et al., 1979; Esatbeyoglu et al., 2011) bewiesen. Auch der gemessene spezifische Drehwinkel $[\alpha]_{589}^{23} +45,8$ (0,1; MeOH) war in einem vergleichbaren Bereich wie bereits publizierte Daten (Saito et al., 2004). Die ESI-HRMS Messung im negativen Modus zeigte ein Fragment mit $m/z\ 865,2001$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, was ein trimeres zwischen den Einheiten einfach verknüpftes Flavan-3-ol mit dihydroxyliertem B-, E- und H-Ring vermuten ließ. Durch die gesamten Daten konnte die Identität der

Verbindung S.d. S3.3 M4 D1 als PC C1 (Epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin) bewiesen werden.

Tabelle 3-7: NMR-Tabelle zu PC C1 (freiphenolisch). Die NMR-Messungen wurden bei -40 °C mit einem AVANCE III HD NMR-Spektroskop (^1H -NMR: 400,13 MHz, ^{13}C -NMR: 100,63 MHz, in $\text{MeOH-}d_4$) durchgeführt.

	Pos.	δ_{C} , Typ (-40°C)	δ_{H} (J in Hz) (-40°C)	δ_{H} (J in Hz) (-20°C)
obere Einheit	2	76.8, CH	5.08, bs	5.07, bs
	3	73.5, CH	3.95, d (1.9)	3.97, d (1.9)
	4	36.9, CH	4.68, bs	4.69, m
	4a	101.4, C		
	5	157.2 ^l , C		
	6	95.7 ^m , CH	5.96 ⁿ , d (2.3)	5.97 ^o , d (2.4)
	7	158.3, C		
	8	95.8 ^m , CH	5.98 ⁿ , d (2.3)	6.00 ^o , d (2.3)
	8a	157.4 ^l , C		
	1'	132.6, C		
	2'	114.9, CH	6.89 ^a , d (1.7)	6.89 ^c , d (1.8)
	3'	145.6, C		
	4'	145.3, C		
	5'	115.7, CH	6.73, d (8.2)	6.73 ^d , d (8.1)
	6'	118.9, CH	6.64 – 6.70 ^b	6.70 ^d
mittlere Einheit	2	76.7, CH	5.26, bs	H ₂ O-signal
	3	73.2, CH	3.90, d (2.1)	3.93, d (2.0)
	4	37.1, CH	4.68, bs	4.69, m
	4a	102.0, C		
	5	157.0, C		
	6	96.6, CH	5.88, s	5.89, s
	7	155.9, C		
	8	106.8, C		
	8a	154.1, C		
	1'	132.6, C		
	2'	114.8, CH	7.02, d (1.3)	7.02, d (1.6)
	3'	145.8, C		
	4'	145.3, C		
	5'	115.7, CH	6.64 – 6.70 ^b	6.71 ^d , d (8.6)
	6'	118.4, CH	6.64 – 6.70 ^b	6.69 ^d , d (6.9)
untere Einheit	2	79.4, CH	4.99, bs	4.99, bs
	3	66.8, CH	4.30, m	4.31, m
	4	29.9, CH ₂	2.80, d (16.1) 2.95, dd (16.6, 4.1)	2.81, dd (16.9, 1.8) 2.95, dd (16.6, 4.1)
	4a	99.7, C		
	5	156.9, C		
	6	97.0, CH	5.93, s	5.93, s
	7	156.1, C		
	8	107.5, C		
	8a	154.1, C		
	1'	132.0, C		
	2'	115.0, CH	7.10, d (1.7)	7.11, d (1.8)
	3'	146.0, C		
	4'	145.3, C		
	5'	115.6, CH	6.74, d (8.2)	6.75, d (8.2)
	6'	118.7, CH	6.88 ^a , dd (8.0, 1.5)	6.90 ^c , dd (8.2, 1.9)

^{a-d} Signale mit den gleichen Buchstaben überlappen

^{l-o} Signale mit den gleichen Buchstaben sind austauschbar

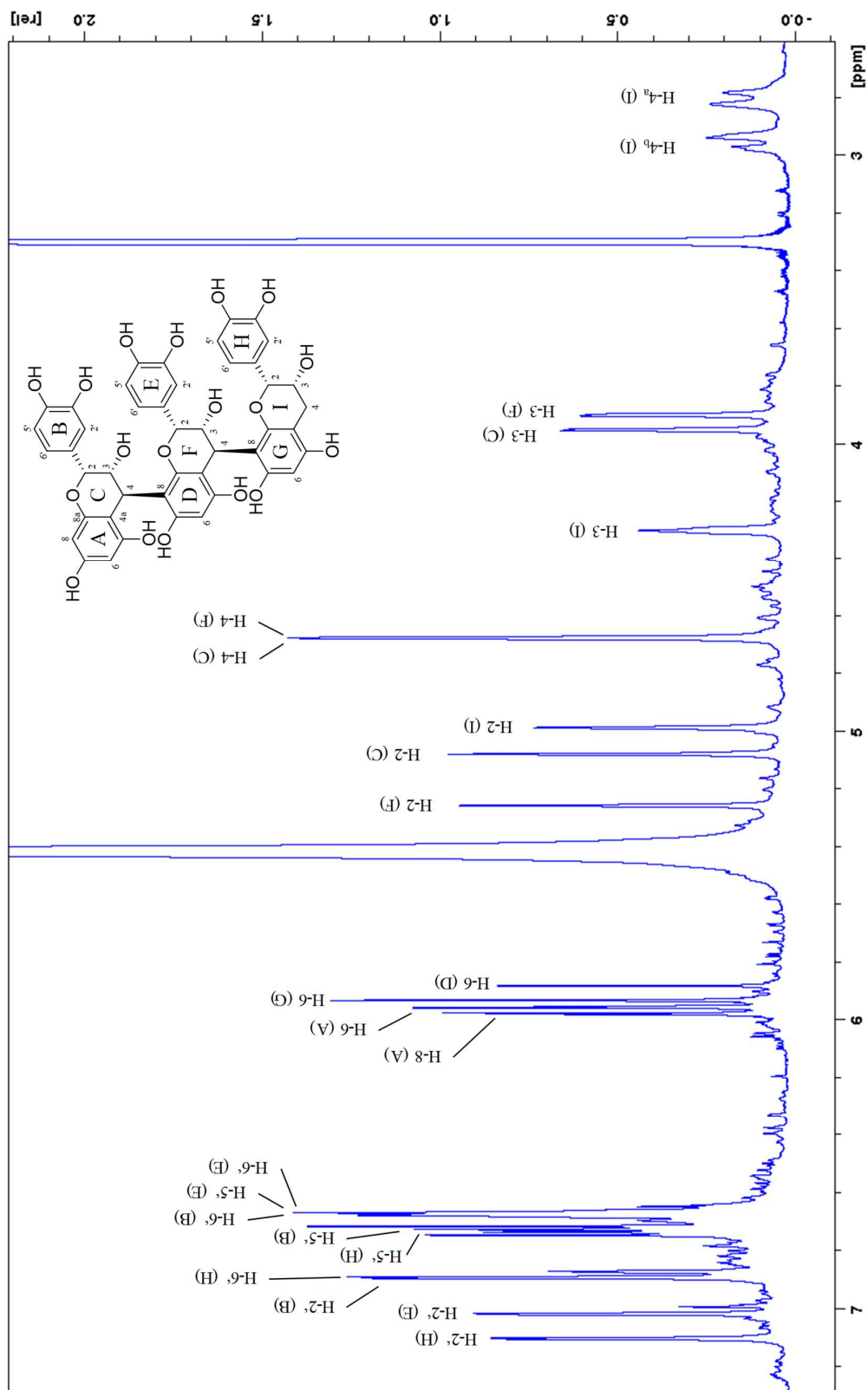


Abb. 3-23: ^1H -NMR-Spektrum von PC C1(S.d. S3.3 M4 D1) gelöst in $\text{MeOH-}d_4$ bei -40°C , AVANCE III HD 400,13 MHz (^1H -NMR).

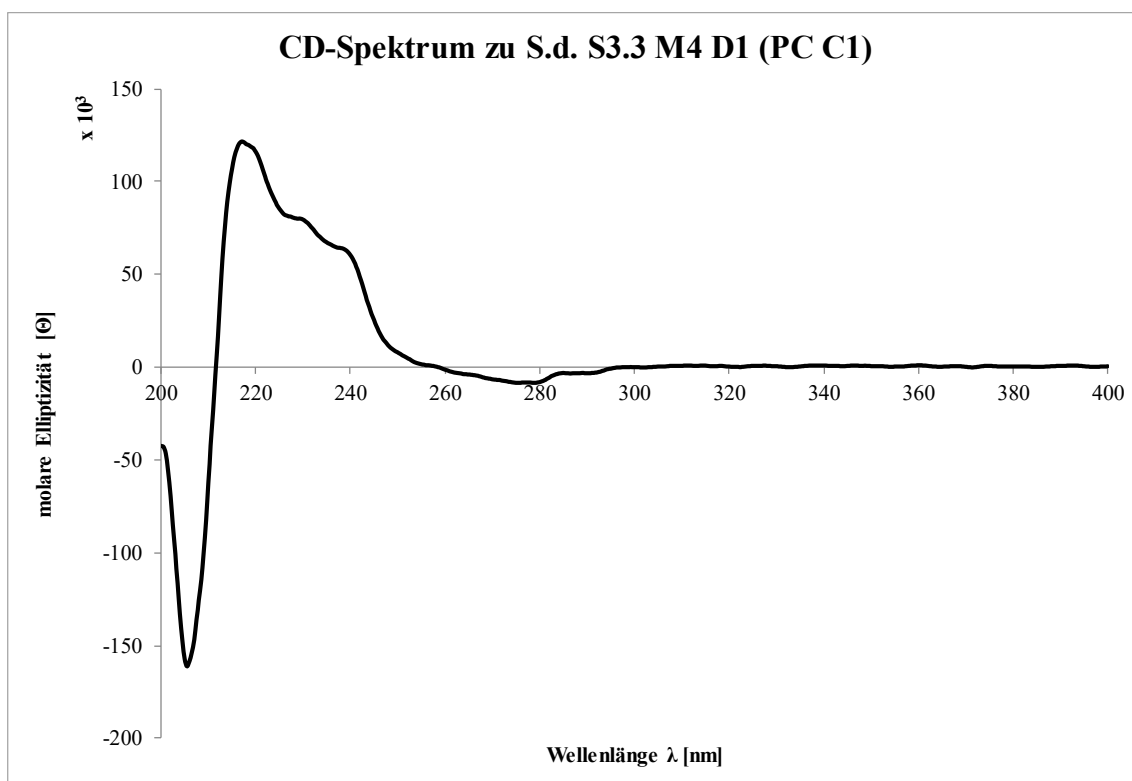


Abb. 3-24: CD-Spektrum zur Verbindung S.d. S3.3 M4 D1, bzw. PC C1. CD (MeOH, Θ) 205.5 (-161056.0), 217 (+121294.0), 229.5 (+79868.8), 238 (+63979.8), 279 (-8569.24)

3.2.9 Epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin

Diese Verbindung eluierte in Fraktion S.d. S3.3 zwischen 2986 - 4154 mL von der Sephadex® LH-20 Säule (vgl. Kapitel 3.6.4). Beim nächsten Fraktionierungsschritt an MCI-Gel® CHP20P wurde sie zwischen 837 - 1302 mL in Fraktion S.d. S3.3 M2 detektiert (vgl. Kapitel 3.6.5). Die finale Aufreinigung fand an einer präparativen HPLC mit dem HPLC-System C statt. Dabei wurde diese Verbindung bei $R_t = 7,6$ min UV-metrisch erfasst (S.d. S3.3 M2 D1, vgl. Kapitel 3.6.6). Die Ausbeute betrug nach Lyophilisation 20,5 mg.

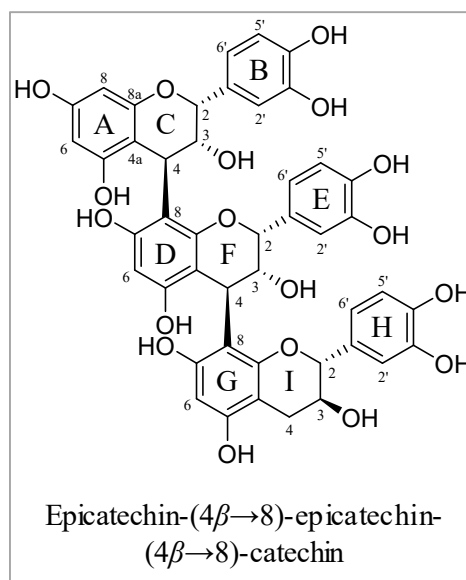


Tabelle 3-8 und **Abb. 3-25** zeigen die zugordneten

NMR-Signale für die vorliegende Verbindung. Die ^1H -NMR-Daten bei -20 °C zeigen große Übereinstimmung mit den Ergebnissen bei Shoji et al. (2003). Im Gegensatz zur erwähnten Literatur wurden für H-3 im C- (δ 3.99, d, $J = 1.8$ Hz) und F-Ring (δ 4.07, d, $J = 1.3$ Hz) andere Daten erhalten (Shoji et al. (2003): H-3 (C-Ring): δ 3.99, d, $J = 5$ Hz; H-3 (F-Ring): δ 4.06, d, $J = 8$ Hz). Vermutlich handelt es sich in der entsprechenden Quelle um einen Tippfehler, da es sich aufgrund der hier detektierten Kopplungskonstanten klar um 2,3-*cis*-konfigurierte monomere Einheiten handeln sollte. Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit ein vollständiger NMR-Datensatz bei -40 °C erarbeitet. Die Konfiguration an den jeweiligen C-4 der oberen und mittleren Einheiten wurde wieder über die CD-Daten belegt, die kongruent zu den von Esatbeyoglu et al. (2011) publizierten Daten sind. Der spezifische Drehwert $[\alpha]_{589}^{23} +115,3$ (0,1; MeOH) ist nach Abgleich mit dem von Saito et al. (2004) veröffentlichten Wert der abschließende Beweis für die absolute Stereochemie. Die ESI-HRMS Messung im negativen Modus zeigte ein Fragment m/z 865,1988 $[\text{M}-\text{H}]^-$, welches ein trimeres Flavan-3-ol mit jeweils einfach verknüpften Monomeren und dihydroxyliertem B-, E- und H-Ring nahelegt. Insgesamt bestätigten die erhobenen Daten die Identität der Verbindung S.d. S3.3 M2 D1 als Epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin.

Tabelle 3-8: NMR-Tabelle zu Epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin (freiphenolisch). Die NMR-Messungen wurden bei -40 °C und -20 °C mit einem AVANCE III HD NMR-Spektrometer (¹H-NMR: 400,13 MHz, ¹³C-NMR: 100,63 MHz, in MeOH-*d*₄) durchgeführt.

	Pos.	δ_C , Typ (-40°C)	δ_H (J in Hz) (-40°C)	δ_H (J in Hz) (-20°C)
obere Einheit	2	76.7, CH	5.08 ^f , bs	5.07, bs
	3	73.5, CH	3.98, d (1.6)	3.99, d (1.8)
	4	36.8, CH	4.67, bs	4.68, bs
	4a	101.9, C		
	5	158.0 ^p , C		
	6	95.8 ^q , CH	5.95 ^r , d (2.3)	5.97 ^s , d (2.4)
	7	157.8 ^e , C		
	8	95.8 ^q , CH	5.99 ^r , d (2.3)	5.98 ^s , d (2.4)
	8a	157.8 ^{e, m} , C		
	1'	132.5, C		
	2'	114.8, CH	6.90 ^g , d (1.6)	6.90 ⁱ , d (1.8)
	3'	145.6, C		
	4'	145.3, C		
	5'	115.7, CH	6.73 ^h , d (8.3)	6.74 ^j , d (8.0)
	6'	118.9, CH	6.66 – 6.70 ^h	6.67 – 6.72 ^j
mittlere Einheit	2	76.8, CH	5.31, bs	5.29, bs
	3	72.4, CH	4.07, d (1.6)	4.07, d (1.7)
	4	37.0, CH	4.77, bs	4.76, bs
	4a	102.5, C		
	5	157.0, C		
	6	96.6, CH	5.87, s	5.88, s
	7	156.8, C		
	8	106.2, C		
	8a	154.9, C		
	1'	132.8, C		
	2'	114.6, CH	7.04, d (1.5)	7.04, d (1.7)
	3'	145.7, C		
	4'	145.1, C		
	5'	115.7, CH	6.68 ^h , d (8.3)	6.69, d (8.2)
	6'	118.5, CH	6.78, dd (8.1, 1.7)	6.79, dd (8.2, 1.9)
untere Einheit	2	81.3, CH	5.06 ^f , d (4.6)	5.02, d (4.7)
	3	68.0, CH	4.21, q (4.7)	4.19, dd (10.2, 5.1)
	4	25.9, CH ₂	2.50, dd (15.7, 2.8) 2.62, dd (16.4, 4.4)	2.56 ^k , dd (16.6, 4.9) 2.62 ^k , dd (16.9, 5.2)
	4a	99.8		
	5	155.7, C		
	6	96.8, CH	5.89, s	5.89, s
	7	156.4, C		
	8	108.1, C		
	8a	153.6, C		
	1'	132.3, C		
	2'	113.5, CH	6.83, d (1.4)	6.86, d (1.8)
	3'	146.0, C		
	4'	145.6, C		
	5'	115.9, CH	6.71 ^h , d (8.3)	6.72 ^j , d (8.0)
	6'	119.0, CH	6.92 ^g , dd (8.5, 1.6)	6.90 ⁱ , dd (8.1, 1.8)

^{e-k} Signale mit den gleichen Buchstaben überlappen

^{p-s} Signale mit den gleichen Buchstaben sind austauschbar

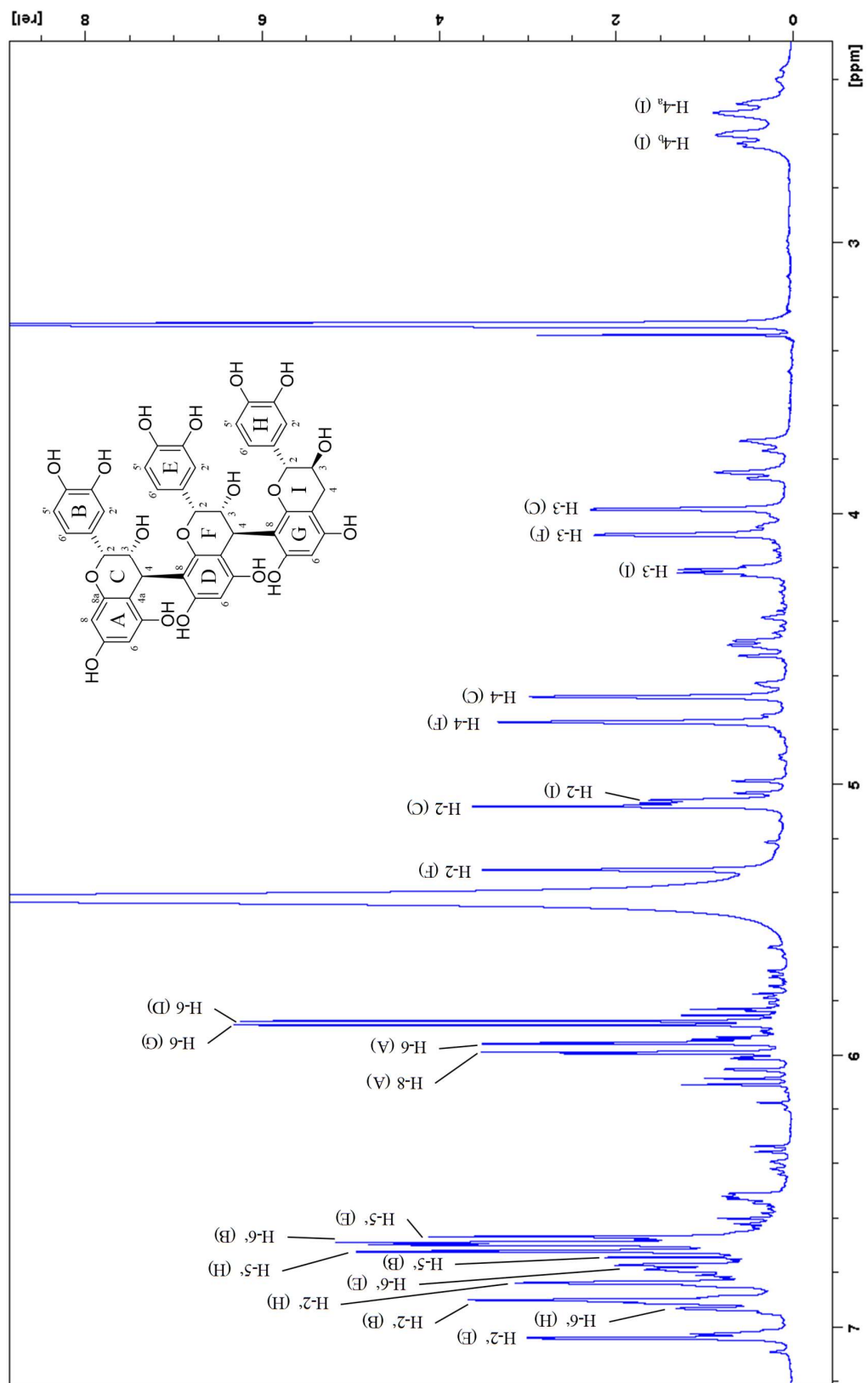


Abb. 3-25: ^1H -NMR-Spektrum von Epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin (S.d. S3.3 M2 D1) in $\text{MeOH-}d_4$ gelöst bei -20 °C, AVANCE III HD 400,13 MHz (^1H -NMR).

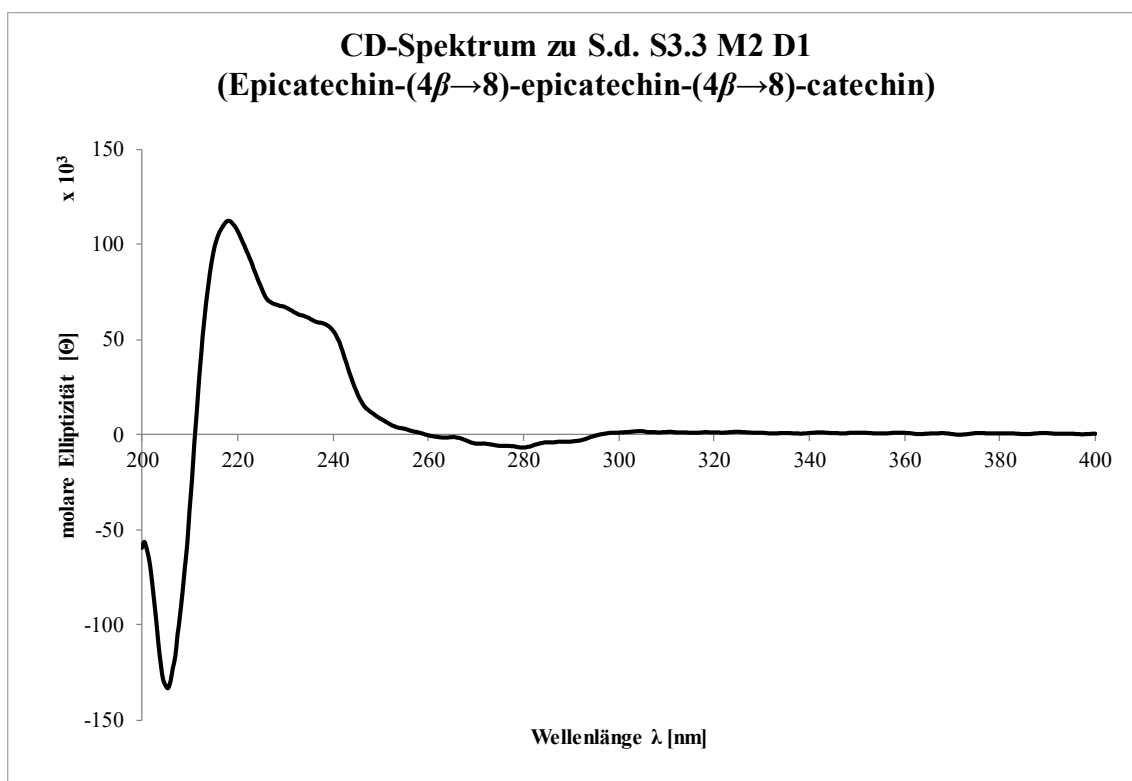


Abb. 3-26: CD-Spektrum zur Verbindung S.d. S3.3 M2 D1, bzw. Epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin. CD (MeOH, Θ) 205.5 (-132845.0), 218 (+112144.0), 229.5 (+67413.4), 237 (+58945.7), 280 (-6730.77).

3.2.10 Epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin

Diese Verbindung eluierte in Fraktion S.d. S3.4 zwischen 4154 - 4634 mL von der Sephadex® LH-20 Säule (vgl. Kapitel 3.6.4). Beim nächsten Fraktionierungsschritt an MCI-Gel® CHP20P wurde diese Substanz zwischen 992 - 1333 mL in Fraktion S.d. S3.4 M2 detektiert (vgl. Kapitel 3.6.5). Die finale Aufreinigung fand an einer präparativen HPLC mit dem HPLC-System D statt. Dabei wurde diese Verbindung bei $R_t = 12,9$ min UV-metrisch erfasst (S.d. S3.4 M2 D2, vgl. Kapitel 3.6.6). Die Ausbeute betrug nach Lyophilisation 15,3 mg.

Die Identifizierung dieser Struktur wurde über die von Saito et al. (2009) publizierten Daten realisiert. Die hier ermittelten NMR-Daten sind zusammen mit der Zuordnung zur jeweiligen Position im Molekül in **Tabelle 3-9** und **Abb. 3-28** gezeigt. Die NMR-Daten bei -20 °C stimmten mit der Ausnahme einer um 0,08 ppm niedrigeren chemischen Verschiebung für H-2 des L-Rings (δ 5,04 ppm, d, $J = 5,0$ Hz) überein. Allerdings wurde es von den Autoren versäumt, die Signale den jeweiligen Positionen zuzuordnen. Die Werte der positiven Cotton Effekte zwischen 220-240 nm in den CD-Spektren sind in den hier isolierten Verbindungen mit zunehmender Anzahl β -konfigurierter C-4-Atome immer weiter angestiegen. Dieser Trend setzte sich bei dieser Verbindung fort, sodass die Hypothesen von Barrett et al. (1979) und Esatbeyoglu et al. (2011) auf das gesamte Molekül übertragen wurden. Danach sollten alle drei C-4-Atome in den oberen drei Einheiten β -konfiguriert sein. Der ermittelte spezifische Drehwert $[\alpha]_{589}^{24} +74,9$ (0,1; MeOH) liegt ebenfalls in dem von Saito et al. (2009) gemessenen Bereich. Die ESI-HRMS Messung lieferte ein Fragment mit m/z 1153,2624 $[M-H]^-$, welches auf ein quartäres Flavan-3-ol mit jeweils einfach verknüpften Monomeren und dihydroxyliertem B-, E-, H- und K-Ring hindeutete. Insgesamt beweisen die erhobenen Daten die Identität von S.d. S3.4 M2 D2 als Epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin.

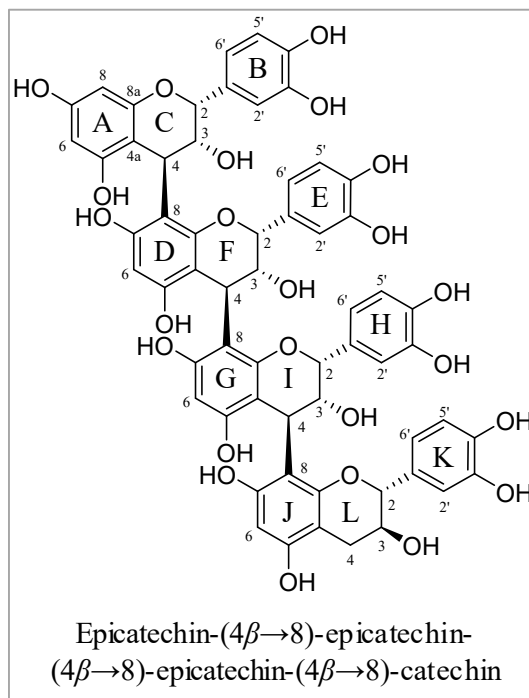


Tabelle 3-9: NMR-Tabelle zu Epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin (freiphenolisch). Die NMR-Messungen wurden bei -40 °C (¹H- und ¹³C-NMR) und -20 °C mit einem AVANCE III HD NMR-Spektrometer (¹H-NMR: 400,13 MHz, ¹³C-NMR: 100,63 MHz, in MeOH-*d*₄) durchgeführt.

	Pos.	δ_C , Typ (-40°C)	δ_H (J in Hz) (-40°C)	δ_H (J in Hz) (-20°C)
obere Einheit	2	76.5, CH	5.28, bs	H ₂ O-Signal
	3	73.2, CH	4.08, d (1.6)	4.10 ^g , d (2.1)
	4	37.3, CH	4.74, bs	4.75, bs
	4a	102.3, C		
	5	157.9 ^{a,k} , C		
	6	95.7 ^l , CH	5.96 ^m , d (2.1)	5.98 ⁿ , d (2.3)
	7	158.9, C		
	8	95.8 ^l , CH	5.99 ^m , d (2.2)	6.01 ⁿ , d (2.3)
	8a	157.9 ^{a,k} , C		
	1'	132.6, C		
	2'	114.7, CH	7.11, d (1.0)	7.10, d (1.6)
	3'	145.7 ^b , C		
	4'	145.1, C		
	5'	115.7, CH	6.69 – 6.72 ^d	6.70 ^h , d (8.1)
	6'	118.4, CH	6.75 ^d , m*	6.77, dd (8.5, 1.7)
obere mittlere Einheit	2	76.7, CH	5.09 ^e , bs	5.08, bs
	3	73.6, CH	3.97, d (1.6)	3.99, d (1.8)
	4	36.9, CH	4.72, bs	4.72, bs
	4a	102.1, C		
	5	157.3, C		
	6	96.8, CH	5.92, s	5.93, s
	7	156.7, C		
	8	106.5, C		
	8a	155.0, C		
	1'	132.5, C		
	2'	114.9, CH	6.90, d (1.6)	6.90 ⁱ , d (1.5)
	3'	145.8 ^c , C		
	4'	145.3, C		
	5'	115.7, CH	6.74 ^d , m*	6.74 ^h , d (8.1)
	6'	118.9, CH	6.68 ^d , dd (8.1, 1.3)	6.69 ^h , dd (8.5, 1.7)
untere mittlere Einheit	2	76.8, CH	5.37, bs	5.34, bs
	3	72.1, CH	4.12, d (1.3)	4.11 ^g , d (2.1)
	4	37.1, C	4.79, bs	4.78, bs
	4a	102.7, C		
	5	157.7, C		
	6	96.8, CH	5.93, s	5.92, s
	7	156.4, C		
	8	107.0, C		
	8a	154.8, C		
	1'	132.7, C		
	2'	114.8, CH	7.04, d (1.4)	7.05, d (1.7)
	3'	145.8 ^c , C		
	4'	145.2, C		
	5'	115.7, CH	6.70 ^d , m*	6.72 ^h , m*
	6'	118.6, CH	6.82 ^f , m*	6.82, dd (8.3, 1.2)

Fortsetzung zu **Tabelle 3-9:**

	Pos.	δ_C , Typ (-40°C)	δ_H (J in Hz) (-40°C)	δ_H (J in Hz) (-20°C)
	2	81.3, CH	5.08 ^e , d (4.5)	5.04, d (5.0)
	3	68.0, CH	4.22, m	4.19, m
	4	25.9, CH ₂	2.50, dd (16.5, 4.6)	2.56 ⁱ , dd (16.5, 4.6)
			2.62, dd (16.7, 4.6)	2.63 ⁱ , dd (16.7, 4.6)
untere Einheit	4a	99.8, C		
	5	155.7, C		
	6	96.5, CH	5.89, s	5.89, s
	7	157.9 ^a , C		
	8	108.1, C		
	8a	153.6, C		
	1'	132.3, C		
	2'	113.5, CH	6.84 ^f , d (1.3)	6.87, d (1.8)
	3'	146.1, C		
	4'	145.7 ^b , C		
	5'	115.7, CH	6.71 ^d , m*	6.72 ^h , m*
	6'	119.0, CH	6.93, dd (8.5, 1.3)	6.91 ⁱ , dd (8.4, 1.7)

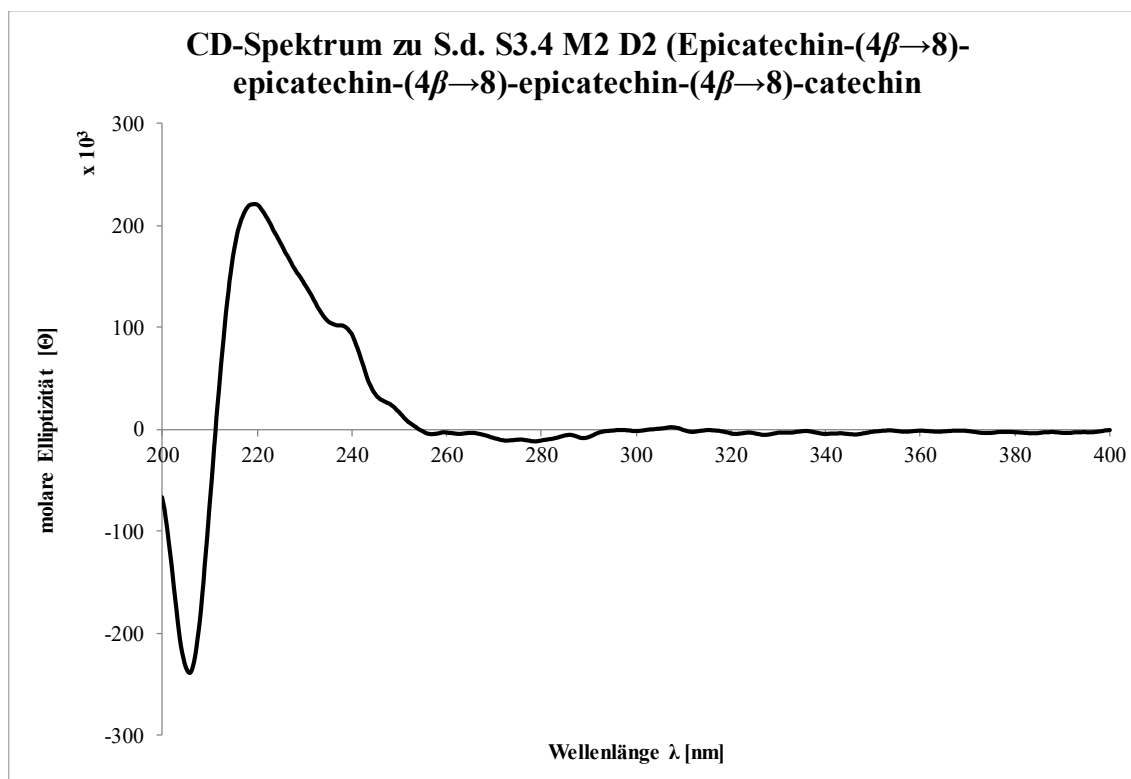
^{a-j} Signale mit den gleichen Buchstaben überlappen.^{k-n} Signale mit den gleichen Buchstaben sind austauschbar.

Abb. 3-27: CD-Spektrum zur Verbindung S.d. S3.3 M2 D2, bzw. Epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin. CD (MeOH, Θ) 206 (-237987.0), 219.5 (+220751.0), 237.5 (+102010.0), 248 (+25022.5), 279 (-11654.7).

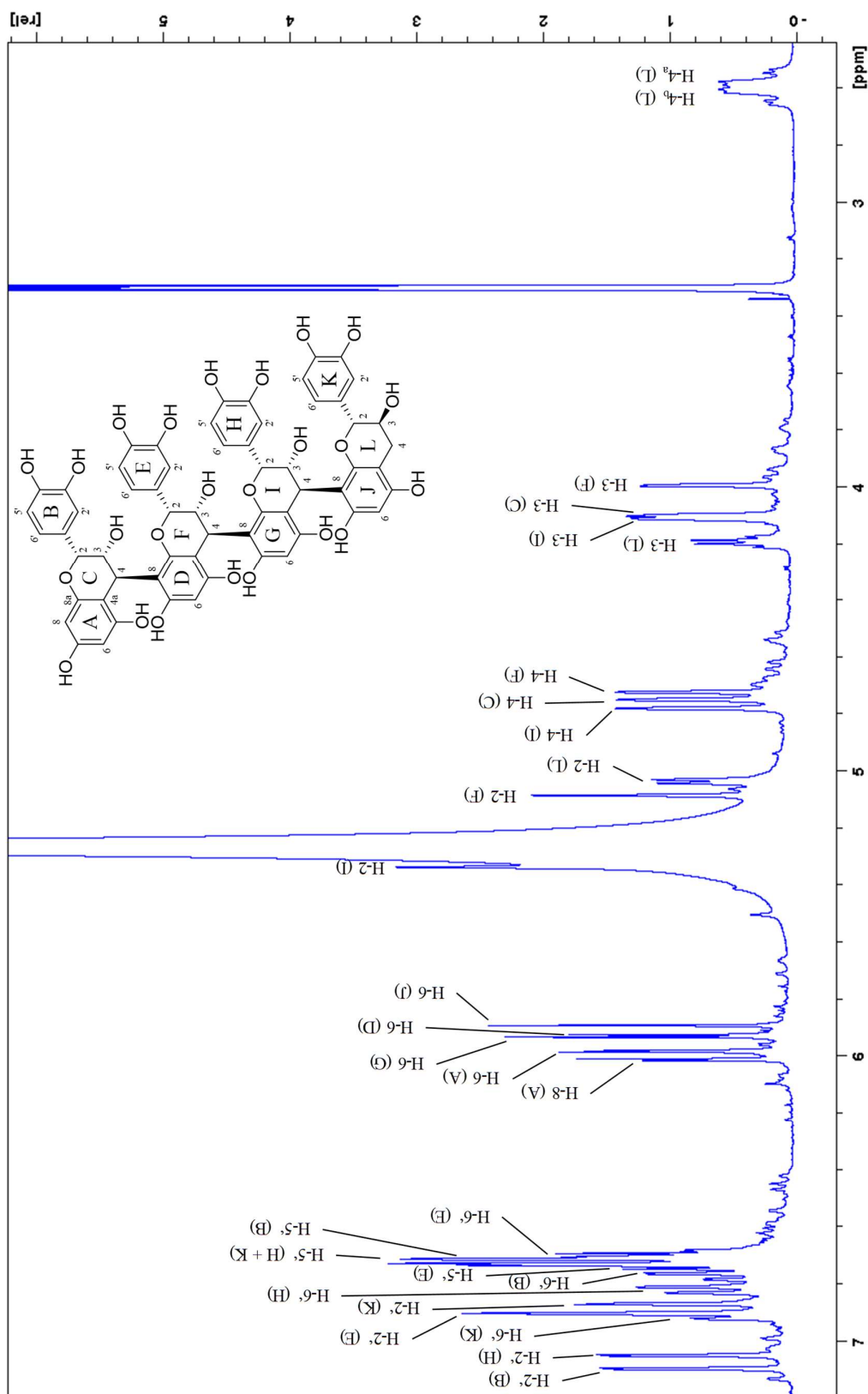
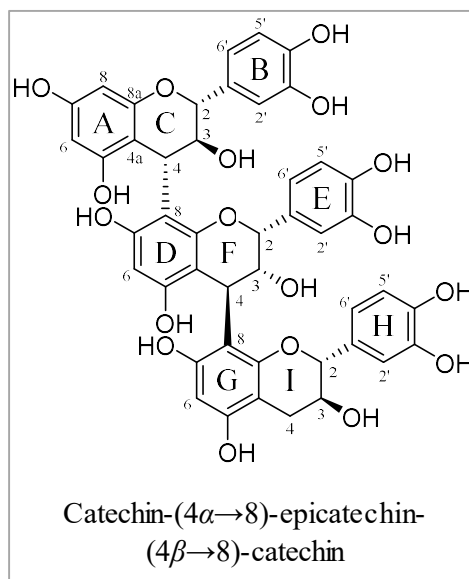


Abb. 3-28: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung Epicatechin-(4β→8)-epicatechin-(4β→8)-epicatechin-(4β→8)-catechin (S.d. S3.4 M2 D2) in MeOH-*d*₄ gelöst bei -20 °C, AVANCE III HD 400,13 MHz (¹H-NMR).

3.2.11 Catechin-(4 α →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin

Diese Verbindung eluierte zwischen 4634 - 5104 mL in Fraktion S.d. S3.5 von der Sephadex® LH-20 Säule (vgl. Kapitel 3.6.4). Beim nächsten Fraktionierungsschritt an MCI-Gel® CHP20P wurde diese Substanz zwischen 1659 - 1829 mL in Fraktion S.d. S3.5 M5 detektiert (vgl. Kapitel 3.6.5). Die finale Aufreinigung fand an einer präparativen HPLC mit dem HPLC-System D statt. Dabei wurde diese Verbindung bei $R_t = 11,4$ min UV-metrisch erfasst (S.d. S3.4 M2 D2, vgl. Kapitel 3.6.6). Die Ausbeute betrug nach Lyophilisation 8,3 mg.



Da für diese Struktur keine experimentellen spektroskopischen Daten gefunden werden konnten (SciFinder®), musste der Beweis über die Interpretation des gesamten erarbeiteten Datensatz gewonnen werden. Die Strukturaufklärung konnte unter Berücksichtigung der relativen Stereochemie über den NMR-Datensatz erfolgen. Allerdings stellte sich die Identifizierung der Verknüpfung zwischen dem C- und D-Ring als besondere Herausforderung heraus. In **Abb. 3-29** sind die HMBC-Signale eingezeichnet, die zur Bestimmung der Verknüpfung zwischen den Monomeren nötig sind. Bereits bei den vorher besprochenen Verbindungen fiel auf, dass im Falle einer 2,3-*cis*-konfigurierten Einheit keine 3J -Kopplung im HMBC von dem jeweiligen H-2 zum entsprechenden C-8a detektiert werden konnte. Bei 2,3-*trans*-Einheiten war dies immer möglich, so auch hier bei der oberen und der unteren Einheit. Dieses Phänomen könnte auf verschiedene Konformationen im C-Ring zurückzuführen sein. In **Abb. 3-30** sind die möglichen C-Ring-Konformationen demonstriert. Dazu wurden bereits durch Engel et al. (1978) durch Röntgenkristallographie das C-2 Sofa und der Halbstuhl für ein 2,3-*trans*-konfiguriertes Flavan-3-ol als bevorzugte Konformere belegt. Weitere Arbeiten (Baert et al., 1980; Foo und Porter, 1983) konnten zum einen das C-3 Sofa als begünstigte Form für ein 2,3-*cis*-konfiguriertes Flavan-3-ol beweisen, zum anderen war es Ihnen auch möglich zu zeigen, dass die unterschiedlichen Konformere in unterschiedlichen chemischen Verschiebungen der ^1H -NMR-Signale resultieren. Das bedeutet, dass die gezeigten Konformere die Abschirmung der Atomkerne im magnetischen Feld verändern. Da die Etherbrücken (Pos. 1 im jeweiligen C-Ring) die 3J -Kopplung im HMBC-Experiment scheinbar unterdrückt, wäre es durchaus denkbar, dass das

HMBC-Experiment unter Standard-Bedingungen (s. Experimenteller Teil), nicht sensitiv genug für die Detektion der 3J -Kopplung zwischen H-2 und C-8a eines 2,3-*cis*-konfigurierten Flavan-3-ols ist. Daher wurde der Versuch unternommen, das HMBC-Experiment für eine 2,3-*cis*-konfigurierte Einheit zu optimieren. Dieses Vorhaben wurde zusammen mit Dr. Ilya Shenderovich (Zentrale Analytik NMR, Universität Regensburg) an der Beispielsubstanz (-)-Epicatechin durchgeführt. Dazu sollte in einem 1D-HMBC-Experiment ganz spezifisch nur diese eine 3J -Kopplung angeregt werden. In **Abb. 3-31** sind die zugehörigen Spektren gezeigt. Für das (-)-Epicatechin konnte die Sensitivität des Experiments deutlich gesteigert werden. Dabei erfolgte die Einstrahlung auf das H-2 bei δ 4.8027 ppm und auf das C-8a bei δ 157.342 ppm. Bereits mit 39 Scans konnte das erwartete Signal detektiert werden. Im Falle der untersuchten Verbindung war dieses Vorhaben jedoch nicht erfolgreich, da auch nach 726 Scans kein Signal detektiert werden konnte. Der Vollständigkeit halber ist die Pulssequenz zu diesem Experiment in **Abb. 3-32** graphisch aufbereitet gezeigt. Die nächste Strategie wäre ein partieller Abbau in Gegenwart von Phloroglucinol gewesen. Allerdings wurde hierfür zu wenig Substanz isoliert, um ausreichende Ausbeuten an Fragmenten erwarten zu können. Außerdem wäre auch in diesem Fall die Detektion der nötigen Kopplung fraglich gewesen. Daher kann diese Struktur nur über den Abgleich mit anderen Verbindungen diskutiert werden. Bei allen isolierten Verbindungen fiel auf, dass an C-6 oder C-8 substituierten D-, bzw. G-Ringen, das C-8a im Vergleich zu C-5 und C-7 am weitesten ins Hochfeld verschoben ist. Demnach sollte das ^{13}C -Signal bei δ 155.7 ppm der Position C-8a in der mittleren Einheit zugeordnet werden können. Die 3J -Kopplung zwischen diesem Signal und dem H-4 des C-Rings würde demnach eine (4 \rightarrow 8)-Verknüpfung anzeigen. Die relative Stereochemie kann auch hier wieder über die Kopplungskonstanten der jeweiligen H-2-Atome (C-Ring: $J = 9.7$ Hz; F-Ring: bs; I-Ring: $J = 5.6$ Hz) und durch die chemische Verschiebung der C-2-Atome (C-Ring: δ 83.6 ppm; F-Ring: δ 77.4 ppm; I-Ring: δ 82.1 ppm) ermittelt werden. Dabei zeigen die Verschiebungen zwischen δ 82 - 84 ppm 2,3-*trans*-konfigurierte Einheiten an und δ 77.4 ppm lässt auf ein 2,3-*cis*-konfiguriertes Monomer schließen (Czochanska et al., 1980; Eberhardt und Young, 1994; Newman et al., 1987). Die Konfiguration an C-4 kann hier auch nur diskutiert werden, da keine Literaturdaten verfügbar sind. Hier hätte ein Phloroglucinolabbau wertvolle Erkenntnisse zeigen können, wenn mehr Substanz isoliert worden wäre. So kann über die CD-Daten (vgl. **Abb. 3-34**) nur eine Schätzung vorgenommen werden. Hier wurden zwischen 220-240 nm ausschließlich negative Cotton-Effekte detektiert, was für eine α -Konfiguration sprechen würde. Vergleicht man nun den Wert bei 236 nm dieser Verbindung (-10903,5) mit dem von PC B3 (-66990,6) und PC B4 (-38178,2), ist der für S.d. S3.5 M5 D2 ermittelte deutlich niedriger. Somit kann auf

das Vorliegen eines α - und β -konfigurierten C-4 in den beiden oberen Einheiten geschlossen werden. Da bei den hier vorliegenden Isolaten im Falle eines Catechins als obere Einheit immer die α -Konfiguration begünstigt war, kann das hier auch für das C-4 im C-Ring postuliert werden. Die deutliche Abschwächung der negativen Ausprägung der Cotton-Effekte zwischen 220-240 nm würde demnach durch das β -konfigurierte C-4 im F-Ring verursacht werden. Das Molekül wurde weiter als trimeres jeweils einfach verknüpftes Flavan-3-ol mit dihydroxyliertem B-, E- und H-Ring über das in der ESI-HRMS Messung detektierte Fragment m/z 865,1982 $[M-H]^-$ untermauert. Durch Polarimetrie wurde ein $[\alpha]_{589}^{24} +73,2$ (0,1; MeOH) ermittelt. Nach Betrachtung und Diskussion aller Ergebnisse wird die Verbindung S.d. S3.5 M5 D2 als Catechin-(4 α →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin postuliert. Die Zuordnung der NMR-Signale ist in **Tabelle 3-10** und **Abb. 3-33** gezeigt.

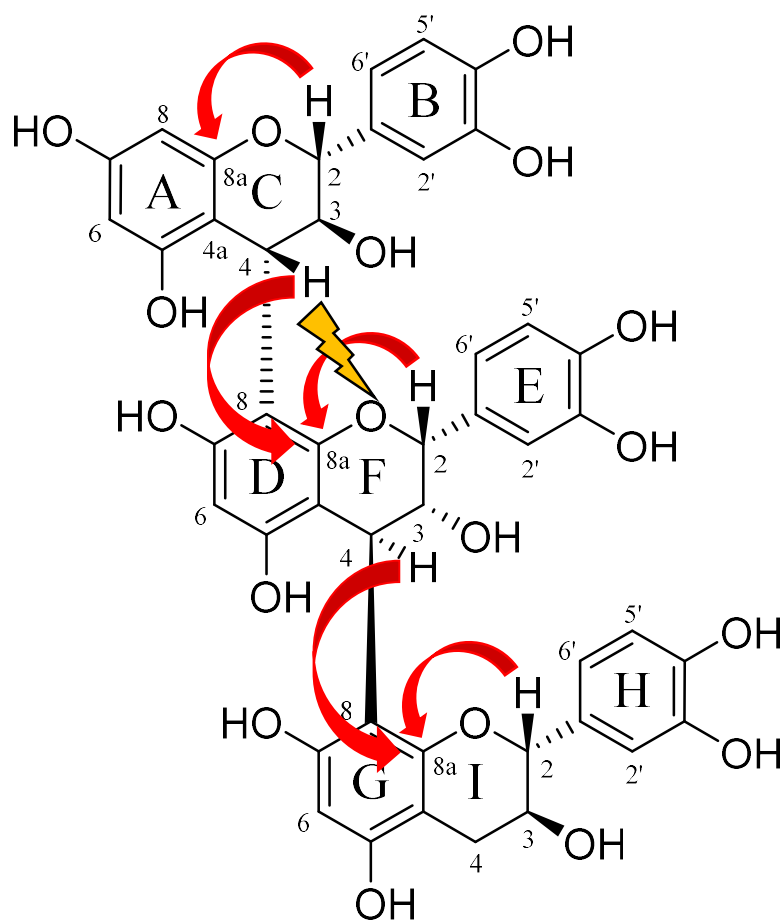


Abb. 3-29: Strategie zur Verifizierung der Verknüpfungsart zwischen den monomeren Einheiten. Die roten Pfeile markieren die relevanten 3J -Kopplungen im HMBC-Experiment. Die Kopplung der Epicatechineinheit von H-2 (F-Ring) zu C-8a (D/F-Ring) konnte nicht detektiert werden, was durch den Blitz kenntlich gemacht ist.

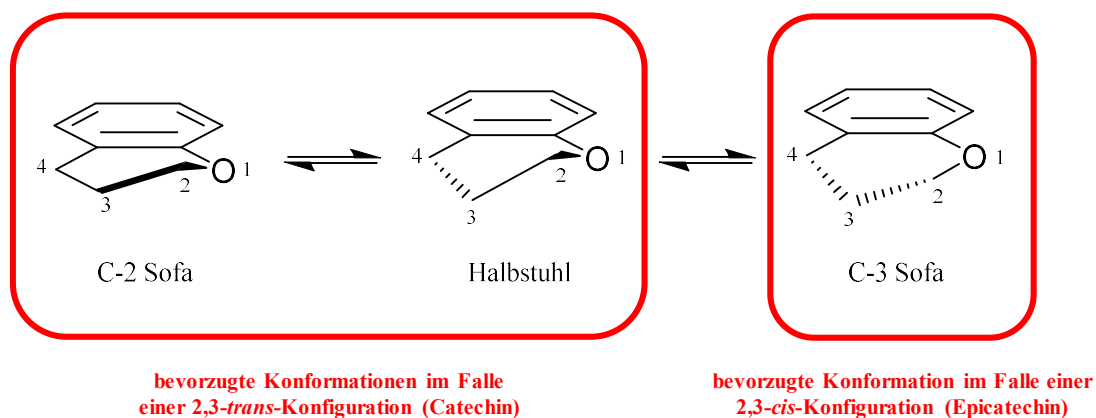


Abb. 3-30: Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Konformationen des C-Rings. Dabei sind das C-2 Sofa und der Halbstuhl die bevorzugten Konformere im Falle einer 2,3-*trans*- und das C-3 Sofa im Falle einer 2,3-*cis*-Konfiguration im C-Ring.

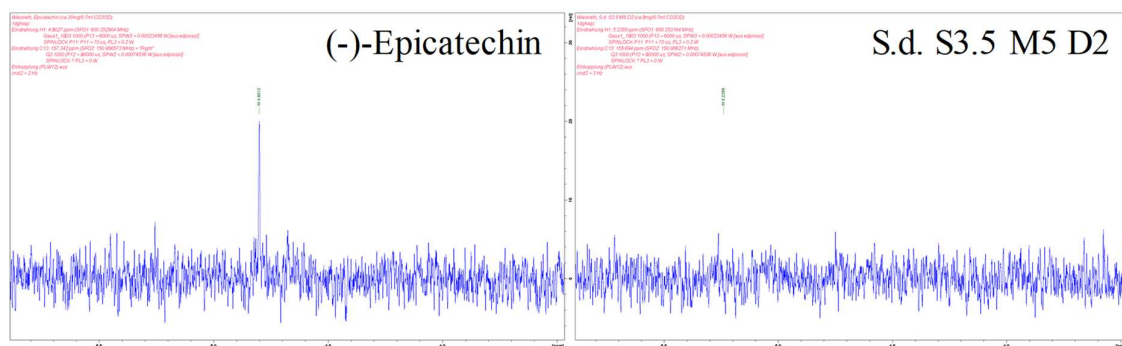


Abb. 3-31: Versuch der Detektion der 3J -Kopplung zwischen H-2 und C-8a. Bei Epicatechin (43 mg/mL, links) war das Experiment bereits mit 39 Scans erfolgreich. Im Falle der mittleren Einheit der Verbindung S.d. S3.5 M5 D2 (11 mg/mL, rechts) konnte auch nach 726 Scans kein Signal ermittelt werden.

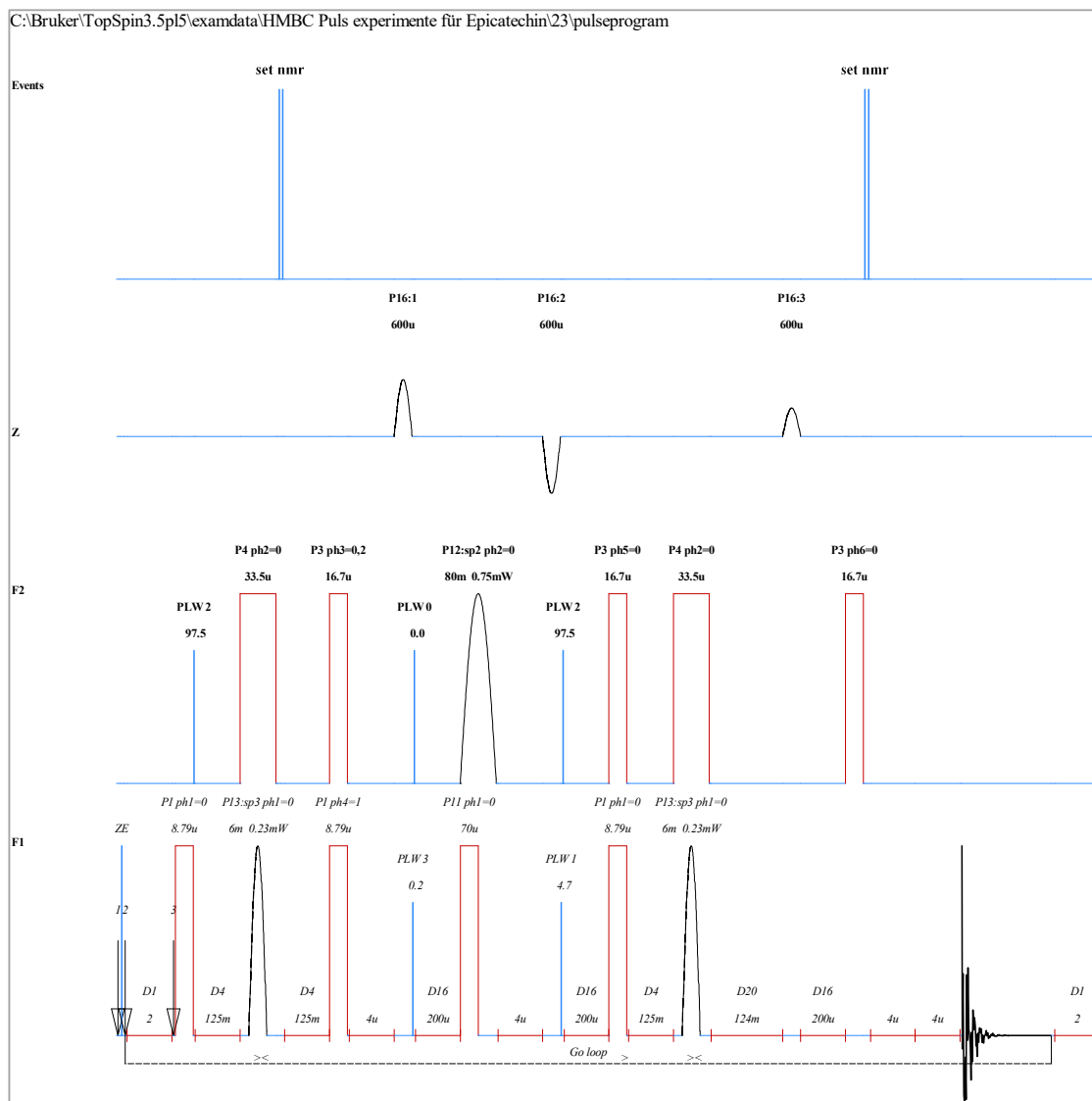


Abb. 3-32: Pulssequenz für das 1D-HMBC-Experiment, um spezifisch die 3J -Kopplung zwischen H-2 und C-8a im Falle in einer 2,3-*cis*-konfigurierten Flavan-3-ol-Einheit zu detektieren. Entscheidend für die Sensitivitätssteigerung des Experiments war die Anpassung der Parameter an Puls P12 (Einstrahlen auf C-8a) und P13 (Einstrahlen auf H-2).

Tabelle 3-10: NMR-Tabelle zu Catechin-(4 α →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin (freiphenolisch). Die NMR-Messungen wurden bei RT mit einem AVANCE III 600 NMR-Spektrometer mit 5 mm TCI CryoProbe (^1H -NMR: 600,25 MHz, ^{13}C -NMR: 150,95 MHz, in $\text{MeOH-}d_4$) durchgeführt.

	Pos.	δ_{C} , Typ	δ_{H} (J in Hz)
obere Einheit	2	83.6, CH	4.47, d (9.7)
	3	73.1, CH	4.66, dd (9.5, 8.1)
	4	39.1, CH	4.72, d (8.0)
	4a	107.2, C	
	5	157.5	
	6	97.8, CH	5.84, m
	7	157.4, C	
	8	96.2, CH	5.83, m
	8a	158.5, C	
	1'	132.2, C	
	2'	116.4, CH	7.01, d (1.9)
	3'	146.6, C	
	4'	146.2, C	
	5'	116.0, CH	6.80, d (8.2)
	6'	121.3, CH	6.87, dd (6.5, 1.7)
mittlere Einheit	2	77.4, CH	5.24, bs
	3	72.8, CH	3.98, bs
	4	37.1, CH	4.74, bs
	4a	101.3, C	
	5	157.2, C	
	6	97.6, CH	5.99, s
	7	157.0, CH	
	8	107.4, C	
	8a	155.7, C	
	1'	133.0, C	
	2'	115.1, CH	7.00, d (1.6)
	3'	145.9, C	
	4'	145.3, C	
	5'	116.0, CH	6.72, d (6.7)
	6'	118.8, CH	6.67, dd (8.2, 1.3)
untere Einheit	2	82.1, CH	4.93, d (5.6)
	3	68.4, CH	4.14, dd (11.1, 5.6)
	4	26.9, CH ₂	2.62, dd (16.3, 6.0) 2.68, dd (16.3, 4.9)
	4a	100.7, C	
	5	155.8, C	
	6	97.4, CH	5.90, s
	7	156.5, C	
	8	107.8, C	
	8a	153.9, C	
	1'	132.6, C	
	2'	114.6, CH	6.90, d (1.7)
	3'	146.0, C	
	4'	146.2, C	
	5'	116.2, CH	6.73, d (8.5)
	6'	119.4, CH	6.87, dd (8.2, 1.3)

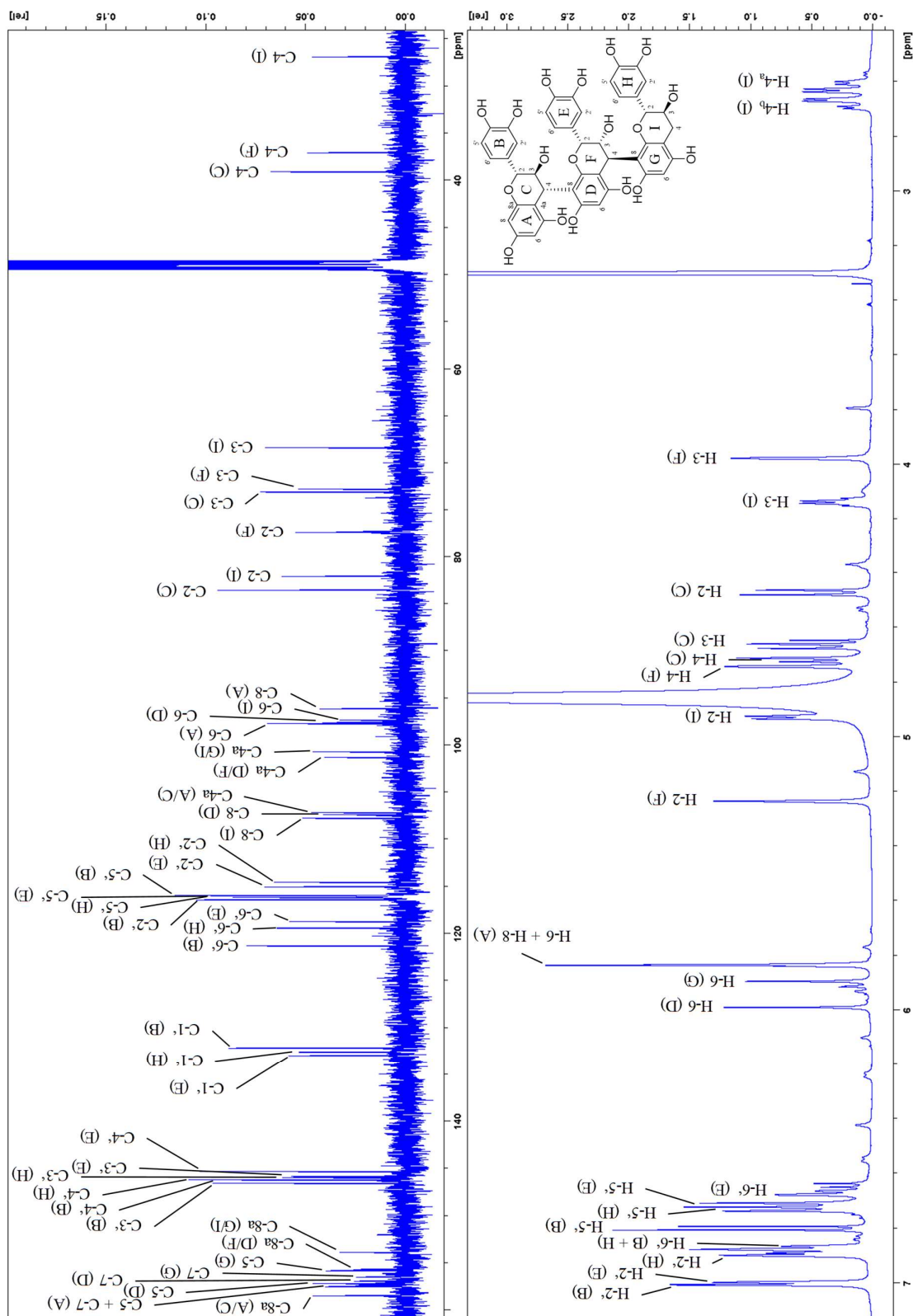


Abb. 3-33: ^{13}C - und ^1H -NMR-Spektrum von Catechin-(4 α →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin (S.d. S3.5 M5 D2) in $\text{MeOH}-d_4$ gelöst bei RT, AVANCE III 600 mit 5 mm TCI CryoProbe 600,25 MHz (^1H -NMR) und 150,95 MHz (^{13}C -NMR).

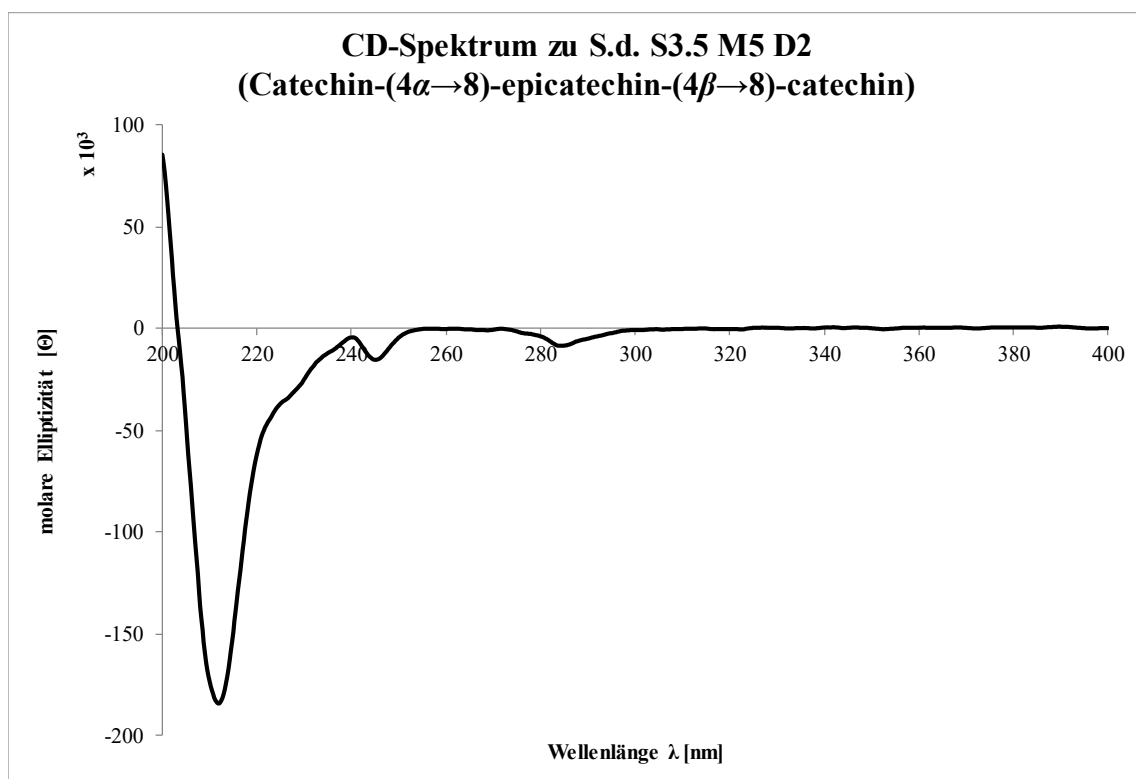


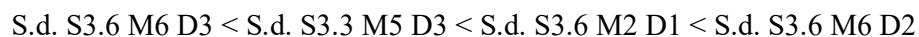
Abb. 3-34: CD-Spektrum zur Verbindung S.d. S3.5 M5 D2, bzw. das mutmaßliche Catechin-(4 α →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin. CD (MeOH, Θ) 212 (-184168), 226,5 (-34493,9), 236 (-10903,5), 240 (-4519,4), 245 (-15540), 284,5 (-8651,4).

3.2.12 Charakterisierung weiterer isolierter oligomerer Procyanidine

In diesem Abschnitt sind alle weiteren isolierten PAs aufgeführt, bei denen keine abschließende Strukturaufklärung möglich war. Das ist darauf zurückzuführen, dass die isolierten Stoffmengen zu gering waren, um die nötigen 2D-NMR-Datensätze zu generieren. Somit konnten die Verknüpfungen zwischen den Monomeren nicht bestimmt werden. Weiter handelt es sich bei allen Verbindungen um verhältnismäßig langkettige PAs, was auch schon in den ^1H -NMR-Spektren zu zahlreichen Überlappungen führte. Es war jedoch möglich, die ESI-HRMS Daten und die spezifischen Drehwerte $[\alpha]_{589}$ zu ermitteln. Dadurch kann über die HRMS Messungen zum einen der DP ermittelt und auch A-Typ-, PP- und PD-Anteile abgeschätzt werden. Czochanska et al. (1980) und Porter (1989) zeigten, dass steigende Anteile von 2,3-*cis*-konfigurierten Monomeren (Epicatechin) positiv mit steigenden $[\alpha]_{578}^{20}$ korreliert sind. Damit kann angenommen werden, dass auch mit $[\alpha]_{589}$ innerhalb einer Gruppe mit gleichem DP die Anteile an Catechin/Epicatechin relativ abgeschätzt werden können.

Mit S.d. S3.5 M5 D1 wurde eine Verbindung mit einer Ausbeute von 3,5 mg isoliert. Sie eluierte auf der Sephadex[®] LH-20 Säule in der Fraktion S.d. S3.5 zwischen 4634-5104 mL (vgl. Kapitel 3.6.4) und auf der MCI-Gel[®] CHP20P Säule in der Fraktion S.d. S3.5 M5 zwischen 1659-1829 mL (vgl. Kapitel 3.6.5). Mit dem präparativen HPLC-System D (vgl. Kapitel 3.6.6) wurde der Peak bei $R_t = 10,7$ min gesammelt. Die ESI-HRMS Messung resultierte in m/z 865,1997 $[\text{M-H}]^-$, wodurch die Summenformel $\text{C}_{45}\text{H}_{38}\text{O}_{18}$ (calcd. m/z 865,1985 $[\text{M-H}]^-$) errechnet wurde. Abschließend konnte ein spezifischer Drehwert $[\alpha]_{589}^{24} +102,5$ (0,1; MeOH) bestimmt werden. Nach Betrachtung dieser Ergebnisse sollte es sich um ein trimeres Flavan-3-ol mit einfach verknüpften Monomeren und wahrscheinlich dihydroxyliertem B-, E- und H-Ring handeln.

In **Tabelle 3-11** sind die quartären Flavan-3-ole mit dihydroxyliertem B-, E-, H- und K-Ring (DP 4) zusammen mit den ermittelten Parametern aufgeführt. Der Anteil an 2,3-*cis*-konfigurierten Einheiten (χ_{cis}) steigt mit zunehmendem $[\alpha]_{589}^{24}$. Somit konnte eine Reihe mit aufsteigenden χ_{cis} wie folgt gebildet werden:



Die pentameren Flavan-3-ole mit vermutlich dihydroxyliertem B-, E-, H-, K- und N-Ring (DP 5) sind in **Tabelle 3-12** zusammengefasst. Auch hier konnte auf Basis der spezifischen Drehwerte eine Reihe mit aufsteigenden Anteilen 2,3-*cis*-konfigurierter Monomere (χ_{cis}) gebildet werden:

S.d. S3.6 M6 D4 < S.d. S3.7 M4 D1 < S.d. S3.7 M2 D1 \approx S.d. S3.6 M7 D1 \approx

S.d. S3.7 M3 D1 < S.d. S3.7 M4 D2 < S.d. S3.6 M3 D1

Die ermittelten Parameter der beiden isolierten hexameren Flavan-3-ole mit wahrscheinlich dihydroxyliertem B-, E-, H-, K-, N- und Q-Ring (DP 6) sind in **Tabelle 3-13** aufgeführt. Dabei zeigte S.d. S3.7 M5 D2 einen größeren Anteil 2,3-*cis*-konfigurierter Monomere (χ_{cis}) als S.d. S3.7 M3 D2.

Tabelle 3-11: Oligomere Flavan-3-ole mit DP 4 und der Summenformel $C_{60}H_{50}O_{24}$ (calcd. m/z 1153,2619 [M-H]⁻). Die Verbindung S.d. S3.3 M5 D3 wurde mit HPLC-System C, alle anderen mit HPLC-System D isoliert (vgl. Kapitel 3.6.6). Das $[\alpha]_{589}^{24}$ wurde stets in MeOH mit einer Konzentration von 0,1% ermittelt.

Verbindung	Sephadex LH-20 [mL]	MCI CHP20P [mL]	R_f HPLC [min]	Ausbeute [mg]	HRMS [M-H] ⁻ [Da]	$[\alpha]_{589}^{24}$
S.d. S3.3 M5 D3	2986-4154	1705-2015	13,9	5,4	1153,2585	+52,1
S.d. S3.6 M2 D1	5104-6489	868-1147	13,4	8,5	1153,2614	+109,2
S.d. S3.6 M6 D2	5104-6489	1581-1767	12,6	7,0	1153,2617	+136,6
S.d. S3.6 M6 D3	5104-6489	1581-1767	13,6	9,0	1153,2624	+15,6

Tabelle 3-12: Oligomere Flavan-3-ole mit DP 5 und der Summenformel $C_{75}H_{62}O_{30}$ (calcd. m/z 720,1590 [M-2H]²⁻). Alle Verbindungen wurden mit HPLC-System D isoliert (vgl. Kapitel 3.6.6). Die $[\alpha]_{589}$ wurden mit folgenden Temperaturen [°C] ermittelt: „a“ = 24; „b“ = 25; „c“ = 26. Die Polarimetrie wurde stets in MeOH mit einer Konzentration von 0,1% durchgeführt.

Verbindung	Sephadex LH-20 [mL]	MCI CHP20P [mL]	R_f HPLC [min]	Ausbeute [mg]	HRMS [M-2H] ²⁻ [Da]	$[\alpha]_{589}^T$
S.d. S3.6 M3 D1	5104-6489	1147-1380	14,5	12,4	720,1587	+156,5 ^a
S.d. S3.6 M6 D4	5104-6489	1581-1767	15,2	3,8	720,1580	+17,5 ^a
S.d. S3.6 M7 D1	5104-6489	1767-1984	14,5	7,6	720,1594	+86,6 ^b
S.d. S3.7 M2 D1	6489-8264	1240-1457	15,4	5,1	720,1593	+86,0 ^b
S.d. S3.7 M3 D1	6489-8264	1457-1721	14,8	4,9	720,1589	+87,8 ^b
S.d. S3.7 M4 D1	6489-8264	1721-1907	14,5	3,7	720,1603	+59,1 ^c
S.d. S3.7 M4 D2	6489-8264	1721-1907	15,2	7,6	720,1592	+106,4 ^a

Tabelle 3-13: Oligomere Flavan-3-ole mit DP 6 und der Summenformel $C_{90}H_{74}O_{36}$ (calcd. m/z 864,1907 $[M-2H]^2$). Alle Verbindungen wurden mit HPLC-System D isoliert (vgl. Kapitel 3.6.6). Die $[\alpha]_{589}^T$ wurden bei folgenden Temperaturen $^{\circ}C$ ermittelt: „a“ = 24; „c“ = 26. Die Polarimetrie wurde stets in MeOH mit einer Konzentration von 0,1% durchgeführt.

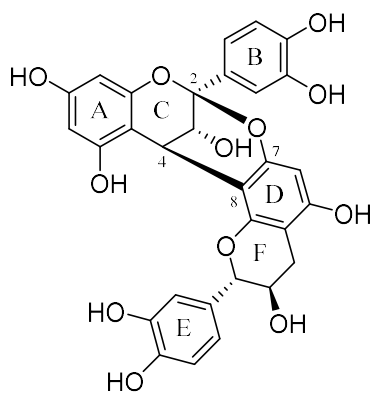
Verbindung	Sephadex LH-20 [mL]	MCI CHP20P [mL]	R_t HPLC [min]	Ausbeute [mg]	HRMS $[M-2H]^2$ [Da]	$[\alpha]_{589}^T$
S.d. S3.7 M3 D2	6489-8264	1457-1721	16,0	14,5	864,1912	+55,3 ^c
S.d. S3.7 M5 D2	6489-8264	1907-2139	16,1	4,3	864,1907	+140,8 ^a

Mit der Verbindung S.d. S3.7 M5 D3 konnte ein heptameres Flavan-3-ol mit vermutlich dihydroxyliertem B-, E-, H-, K-, N-, Q- und T-Ring (DP 7) in einer Ausbeute von 3,1 mg isoliert werden. Diese Substanz eluierte auf der Sephadex[®] LH-20 Säule in der Fraktion S.d. S3.7 zwischen 6489-8264 mL (vgl. Kapitel 3.6.4) und auf der MCI-Gel[®] CHP20P Säule in der Fraktion S.d. S3.7 M5 zwischen 1907-2139 mL (vgl. Kapitel 3.6.5). Die finale Aufreinigung erfolgte mit dem präpartiven HPLC-System D (vgl. Kapitel 3.6.6), wobei der Peak mit der $R_t = 17,5$ min gesammelt wurde. Über die ESI-HRMS Messung mit m/z 671,8139 $[M-3H]^3$ konnte die Summenformel $C_{105}H_{86}O_{42}$ (calcd. m/z 671,8125 $[M-3H]^3$) errechnet werden. Abschließend wurde ein spezifischer Drehwert $[\alpha]_{589}^{24} +168,8$ (0,1; MeOH) bestimmt.

Aus der Fraktion S.d. S3.6 M4 (Sephadex[®] LH-20: 5104-6489 mL; MCI-Gel[®] CHP20P: 1380-1519 mL) wurden drei Peaks unter Verwendung von HPLC-System D (vgl. Kapitel 3.6.6) gesammelt (S.d. S3.6 M4 D1: $R_t = 12,6$ min, Ausbeute = 7,2 mg; S.d. S3.6 M4 D2: $R_t = 14,2$ min, Ausbeute = 3,0 mg; S.d. S3.6 M4 D3: $R_t = 14,6$ min, Ausbeute = 4,6 mg), die sich als PA-Cluster herausstellten. Für S.d. S3.6 M4 D1 wurde ein $[\alpha]_{589}^{25} +53,0$ (0,1; MeOH) über die Polarimetrie ermittelt. Das Interessante war, dass hier über die ESI-HRMS Substanzen detektiert wurden, die sich von allen bisher beschriebenen strukturell unterschieden. Hier wurden folgenden Fragmente mit den daraus resultierenden Summenformeln detektiert:

- m/z 1151,2435 $[M-H]^- \rightarrow C_{60}H_{48}O_{24}$ (calcd. m/z 1151,2463 $[M-H]^-$);
- m/z 719,6528 $[M-2H]^2 \rightarrow C_{75}H_{59}DO_{30}$ (calcd. m/z 719,6543 $[M-2H]^2$) $\rightarrow C_{75}H_{60}O_{30}$;
- m/z 1153,2592 $[M-H]^- \rightarrow C_{60}H_{50}O_{24}$ (calcd. m/z 1153,2619 $[M-H]^-$);

Im Falle der Summenformel $C_{60}H_{50}O_{24}$ sollte es sich um ein reguläres quartäres Flavan-3-ol mit einfach verknüpften Monomeren und dihydroxyliertem B-, E- und H-Ring (DP 4) handeln. Die beiden anderen Strukturen zeigten jedoch mit $C_{60}H_{48}O_{24}$ und $C_{75}H_{60}O_{30}$ jeweils Summenformeln, die zwei H weniger aufweisen als die anderen isolierten quartären und pentameren



Procyanidin A1

Abb. 3-35: PC A1 (Epicatechin-
(4 β →8;2 β →O→7)-catechin).

Flavan-3-ole. Das D in C₇₅H₅₉DO₃₀ ist durch einen Protonenaustausch durch das MeOH-*d*₄ zu erklären, welches für die vorher durchgeführten NMR-Experimente verwendet wurde. Das lässt darauf schließen, dass in beiden Substanzen jeweils ein dimeres A-Typ-Fragment enthalten ist. Bei einem A-Typ sind zwei monomere Einheiten zusätzlich über eine weitere Etherbrücke verknüpft. Dies ist in **Abb. 3-35** beispielhaft an PC A1 gezeigt. Hier ist der C- und D-Ring zusätzlich zur (4 β →8)-Verknüpfung zwischen C-2 (C-Ring) und C-7 (D-Ring) über einen Sauerstoff als Ether verbunden. Dadurch sind in einem solchen Typ zwei H weniger nötig, als bei den einfach verknüpften PAs.

Der PA-Cluster S.d. S3.6 M4 D2 zeigt ein $[\alpha]_{589}^{25} +72,9$ (0,1; MeOH) und folgende ESI-HRMS-Fragmente wurden detektiert:

- m/z 712,1623 [M-2H]²⁻ → C₇₅H₆₂O₂₉ (calcd. m/z 712,1616 [M-2H]²⁻);
- m/z 720,1596 [M-2H]²⁻ → C₇₅H₆₂O₃₀ (calcd. m/z 720,1590 [M-2H]²⁻);

Bei der Summenformel C₇₅H₆₂O₃₀ handelte es sich wahrscheinlich um ein reguläres pentameres Flavan-3-ol mit vermutlich dihydroxyliertem B-, E-, H-, K- und N-Ring (DP 5). Die weitere Summenformel C₇₅H₆₂O₂₉ ließ aufgrund der Anzahl an C-Atomen ebenfalls auf ein PA mit DP 5 schließen, allerdings ist ein Sauerstoff-Atom weniger als bei den entsprechenden PCs vorhanden. Das ist ein starkes Indiz, dass in einem der Monomere ein B-Ring lediglich monohydroxyliert ist. Dies würde das Vorhandensein einer Afzelechin-, bzw. Epiafzelechineinheit, bedeuten.

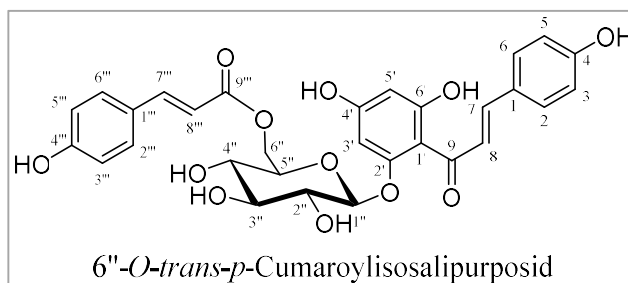
Für den PA-Cluster S.d. S3.6 M4 D3 wurde ein spezifischer Drehwert $[\alpha]_{589}^{26} +43,5$ (0,1; MeOH) bestimmt. Folgende ESI-HRMS Fragmente wurden erfasst:

- m/z 720,1605 [M-2H]²⁻ → C₇₅H₆₂O₃₀ (calcd. m/z 712,1616 [M-2H]²⁻);
- m/z 712,1624 [M-2H]²⁻ → C₇₅H₆₂O₂₉ (calcd. m/z 720,1616 [M-2H]²⁻);

Bei beiden Verbindungen gelten analog alle Ausführungen wie für die in S.d. S3.6 M4 D2 enthaltenen PAs. Es könnte sich auch um die gleichen Substanzen, wie in S.d. S3.6 M4 D2 handeln, da die *R*_s bei der präparativen HPLC sehr nahe zusammenlagen. Somit wären die beiden PA-Cluster nicht sauber voneinander abgetrennt worden.

3.3 Isolierung des Chalkons 6''-O-trans-p-Cumaroylisalipurposid

Diese Verbindung eluierte in der Fraktion S.d. S3.2 zwischen 2200 - 2986 mL von der Sephadex® LH-20 Säule (vgl. Kapitel 3.6.4). Beim nächsten Fraktionierungsschritt an MCI-Gel® CHP20P wurde diese Substanz



zwischen 3345 - 3615 mL in der Fraktion S.d. S3.2 M10 detektiert (vgl. Kapitel 3.6.5). Die finale Aufreinigung fand an einer präparativen HPLC mit dem HPLC-System E statt. Dabei wurde diese Verbindung bei $R_t = 9,2$ min UV-metrisch erfasst (S.d. S3.2 M10 R3, vgl. Kapitel 3.6.6). Die Ausbeute betrug nach Lyophilisation 8,9 mg.

In **Tabelle 3-14** und **Abb. 3-37** sind die NMR-Signale den jeweiligen Positionen im Molekül zugeordnet. Diese Daten waren kongruent zu bestehenden Literaturwerten (Freischmidt, 2011; Zapesochnaya et al., 2002). Die genaue Aufspaltung der Hs der substituierten Glucose konnten hier nicht exakt ermittelt werden, daher werden die entsprechenden Signale (H-2'', H-4'') als pt klassifiziert. In beiden Literaturquellen (Freischmidt, 2011; Zapesochnaya et al., 2002) wurden jedoch keine Daten in Bezug auf die optische Aktivität dieser Verbindung angegeben. Zum einen wurde ein CD-Spektrum in einem Wellenlängenbereich von 200-400 nm aufgenommen (vgl. **Abb. 3-36**), zum anderen wurde via Polarimetrie eine spezifische Rotation $[\alpha]_{589}^{24} +35,1$ (0,1; MeOH) ermittelt. Dieser Parameter wurde nicht bei Freischmidt, 2011 und Zapesochnaya et al., 2002 ermittelt, so dass hier nicht auf Übereinstimmung geprüft werden konnte. Die ESI-HRMS Messung im negativen Modus lieferte für $[M-H]^-$ ein m/z 579,1524 und zeigte Übereinstimmung mit der Literatur (Freischmidt, 2011; Zapesochnaya et al., 2002) und bestätigte die Identität der Verbindung S.d. S3.2 M10 R3 als 6''-O-trans-p-Cumaroylisalipurposid.

Tabelle 3-14: NMR-Tabelle zu 6''-O-trans-p-Cumaroylisalipurposid bei RT mit einem AVANCE III 600 NMR-Spektrometer mit 5 mm TCI CryoProbe (^1H -NMR: 600,25 MHz, ^{13}C -NMR: 150,95 MHz, in MeOH- d_4) durchgeführt. Die Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite.

Pos.	δ_C , Typ	δ_H (J in Hz)
1	128.6, C	
2	131.8, CH	7.60, d (8.6)
3	116.9, CH	6.83, d (8.6)
4	161.1, C	
5	116.9, CH	6.83, d (8.6)
6	131.8, CH	7.60, d (8.6)
7	125.9, CH	8.02, d (15.5)
8	144.0, CH	7.65, d (15.5)
9	194.4, C	

Fortsetzung zu **Tabelle 3-14:**

Pos.	δ_C , Typ	δ_H (J in Hz)
1'	107.7, C	
2'	161.8, C	
3'	96.6, CH	6.24, d (2.0)
4'	166.4, C	
5'	98.7, CH	6.00, d (2.1)
6'	167.9, C	
1''	102.2, CH	5.16, d (7.7)
2''	75.1, CH	3.60, pt (7.9)
3''	78.4, CH	3.54, t (8.9)
4''	71.6, CH	3.48, pt (9.3)
5''	75.9, CH	3.73, m
6''	64.4, CH ₂	4.31, dd (11.9, 6.5) 4.55, dd (11.9, 1.9)
1'''	127.2, C	
2'''	131.3, CH	7.36, d (8.6)
3'''	116.7, CH	6.77, d (8.5)
4'''	161.2, C	
5'''	116.7, CH	6.77, d (8.5)
6'''	131.3, CH	7.36, d (8.6)
7'''	146.9, CH	7.57, d (16.0)
8'''	114.9, CH	6.31, d (15.9)
9'''	169.2, C	

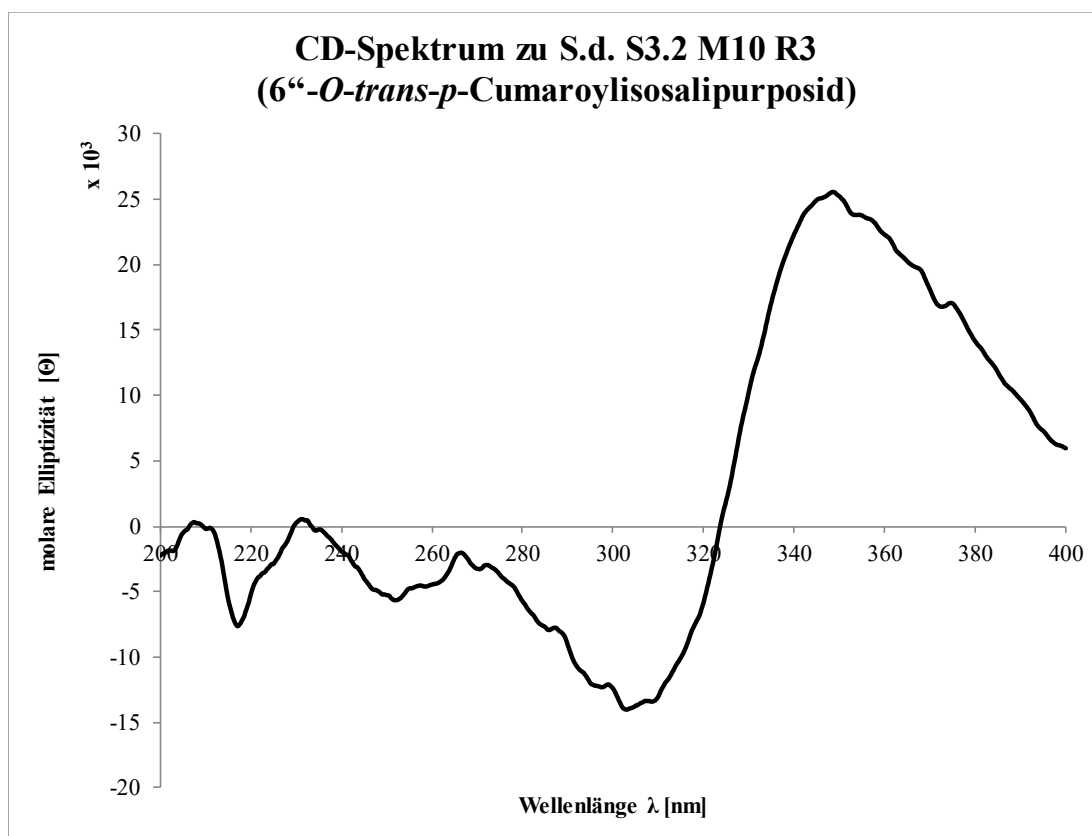


Abb. 3-36: CD-Spektrum zur Verbindung S.d. S3.2 M10 R3, bzw. 6''-O-trans-p-Cumaroylisosalipurposid. CD (MeOH, Θ) 207,5 (+311,5), 217 (-7670,8), 231 (+521,8), 252 (-5672,5), 266,5 (-2041,7), 303 (-14061,1), 348,5 (+25589,8).

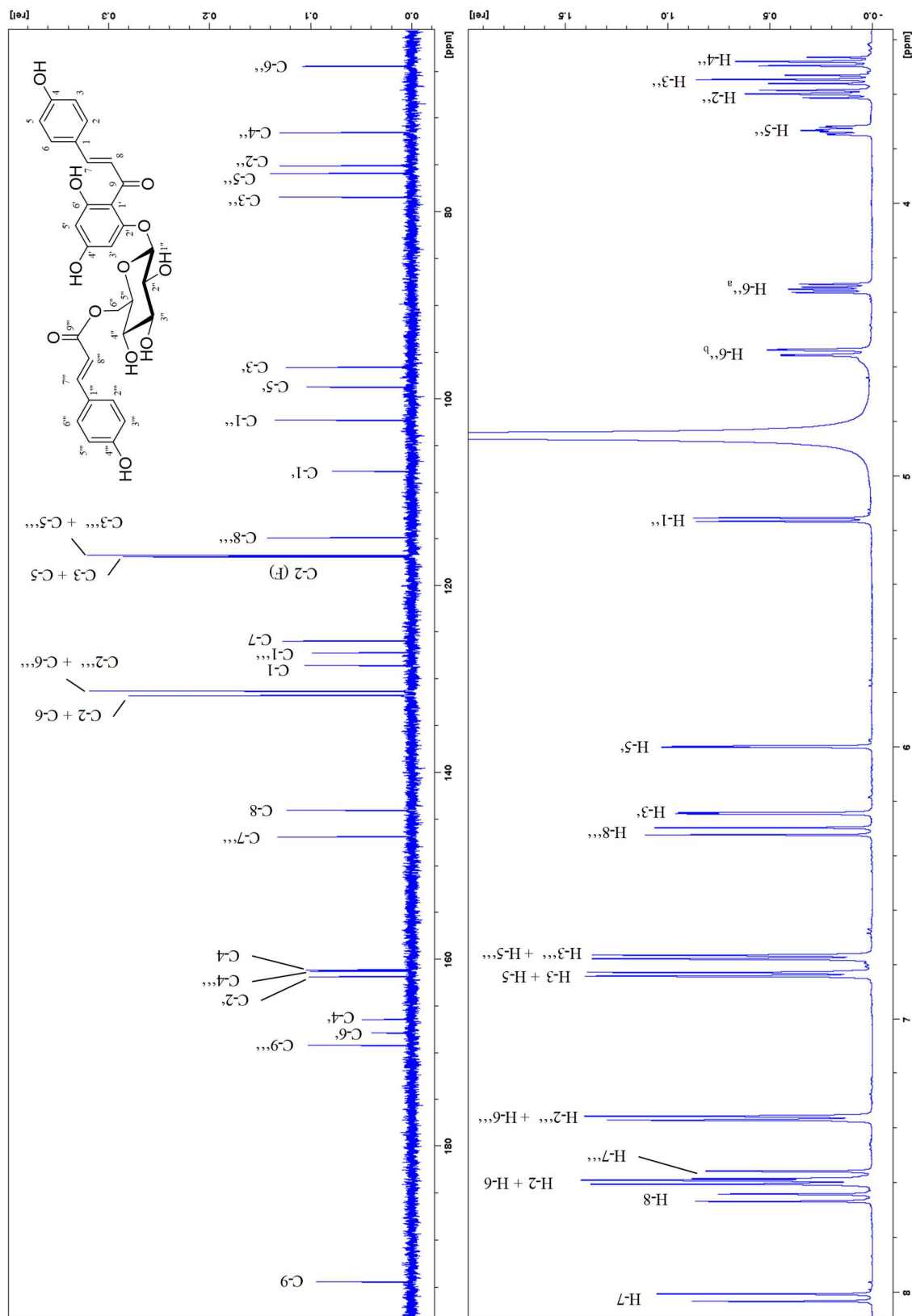


Abb. 3-37: ^{13}C - und ^1H -NMR-Spektrum von 6''-O-trans-p-Cumaroylisalipurposid in $\text{MeOH-}d_4$ bei RT, AVANCE III 600 mit 5 mm TCI CryoProbe 600,25 MHz (^1H -NMR) und 150,95 MHz (^{13}C -NMR).

3.4 Diskussion

Es wurden sechs dimere PCs, drei trimere PCs, ein quartäres PC und das 6''-*O-trans-p*-Cumaroylisalipurposid aus *Salix daphnoides* VILL. isoliert und aufgeklärt. Interessant war die Isolierung von PC B2, da Pobłocka-Olech und Krauze-Baranowska (2008) postuliert hatten, dass dieses PC nicht in Weidenrinden zu finden sei. Allerdings stand im Mittelpunkt genannter Untersuchung die Entwicklung einer HPTLC-Methode zur Identifizierung von PCs. So wäre es denkbar, dass dieses Verfahren nicht sensitiv genug zum Nachweis von PC B2 ist, oder aber Unterschiede im PC-Spektrum zwischen verschiedenen Individuen der gleichen *Salix* Spezies möglich sind. Allerdings war auch in der hier angefertigten Arbeit die isolierte Menge an PC B2 (11,7 mg) im Verhältnis zu PC B1 (70,9 mg) viel geringer. So konnten Pobłocka-Olech und Krauze-Baranowska (2008) die Anwesenheit von PC B1 in 19 von 22 untersuchten Weiden verifizieren. Die hier isolierte Menge kann ein Indiz dafür sein, dass die Konzentration des PC B2 in den dort untersuchten Weidenrinden für die erwähnte HPTLC-Methode unter dem LOD lag. In *Salix alba* L. konnten via HPLC-ESI-MS/MS-Analytik die PCs B1, B3, B6 und B7 nachgewiesen werden (Esatbeyoglu et al., 2010). Auch die vorliegende Studie zeigt, dass PC B1 die dominierende definierte Struktur innerhalb der Fraktion der PAs in *S. daphnoides* ist. Kolodziej (1990) isolierte die PCs B1, B3, B6, B7, C2, Epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin, Catechin-(4 α →8)-catechin-(4 α →6)-catechin, Catechin-(4 α →8)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin und Catechin-(4 α →6)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin aus einer systematisch nicht eingeordneten Weidenrinde. Deprez et al. (1999) waren in der Lage, PC B3, C2 und B6 aus den Kätzchen einer männlichen *Salix caprea* L. zu isolieren. Letztere Verbindung wurde allerdings nur über das chromatographische Profil identifiziert. Jürgenliemk und Mitarbeiter (2007) konnten PC B1, B3, Epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin und Epicatechin-(4 β →8)-catechin-(4 α →8)-catechin aus der Rinde von *Salix purpurea* L. isolieren. Ein großer Teil dieser Verbindungen konnte auch in vorliegender Arbeit gefunden und identifiziert werden (PC B1, B3, B7, Epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin), wobei die größten Ausbeuten für PC B1 (70,9 mg), PC B3 (45,8 mg) und Epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin (20,5 mg) erzielt wurden. Da diese drei Verbindungen auch in den Arbeiten von Kolodziej (1990) und Jürgenliemk et al. (2007) sowie PC B3 von Deprez et al. (1999) in Weiden gefunden werden konnten, kann man davon ausgehen, dass es sich bei diesen PCs um biosynthetisch bevorzugte Stereoisomere dieser Substanzklasse handelt.

Von besonderem Interesse war die Identifizierung von PAs in Clustern (S.d. S3.6 M4 D2, S.d. S3.6 M4 D3), die nach ESI-HRMS-Untersuchungen monohydroxylierte B-Ringe vermuten ließen. Das würde bedeuten, dass hier PP-Anteile (Afzelechin, Epiafzelechin oder deren

Enantiomere) in den Molekülen verbaut sind. Das sind Ergebnisse, die von Weiden bislang noch nicht berichtet wurden. Allerdings war es Foo und Porter (1978) möglich, das dimere PA Gallocatechin-(4 α →8)-catechin aus *S. caprea* zu isolieren und die Struktur als Peracetat aufzuklären. Weiter konnten in einem weiteren Cluster (S.d. S3.6 M4 D1) ein quartäres PA und ein pentameres PA identifiziert werden, in welchen wahrscheinlich ein A-Typ-Fragment verbaut ist. Damit wurde auch hier in Ergänzung zu Foo und Porter (1978) der Nachweis erbracht, dass Weiden durchaus zu größerer struktureller Variation innerhalb der PAs fähig sind. Leider waren die Ausbeuten dieser Isolate zu gering, bzw. deren Anteile an Verunreinigungen zu groß, so dass keine NMR-basierte Strukturaufklärung möglich war. So blieb lediglich übrig, die Resultate der ESI-HRMS Experimente zu interpretieren.

Eine Verbindung, die nicht zur Substanzklasse der Flavan-3-ole gehört, stellt das isolierte Chalkon 6''-*O-trans-p*-Cumaroylisosalipurposid dar. Diese Verbindung konnte bislang nur selten aus Weiden isoliert werden. So war es Freischmidt und Mitarbeitern (Freischmidt et al., 2012; Freischmidt, 2011) möglich, diese Verbindung aus einem kommerziellen Extrakt aus *S. purpurea* (STW 33-I, Steigerwald Arzneimittelwerk GmbH) zu isolieren, und Zapesochnaya et al. (2002) konnten dieses Chalkon in der Rinde von *Salix acutifolia* WILLD. identifizieren. Diese Verbindung wurde schon als möglicher chemotaxonomischer Marker diskutiert (Freischmidt, 2011). *S. acutifolia*, *S. daphnoides* und *S. purpurea* gehören alle dem Subgenus *Vetrix* an (Skvortsov und Zinovjev, 1999). Die ersten beiden Arten werden sogar beide zur 22. Sektion *Daphnella* gerechnet, wohingegen *S. purpurea* der 25. Sektion *Helix* angehört (Skvortsov und Zinovjev, 1999). Diese systematische Einteilung beruht allerdings lediglich auf morphologischen Merkmalen, sodass die Verifizierung dieser Taxonomie auf Basis sekundärer Metabolite oder genetischen Untersuchungen sehr interessant wäre. Die Sektion *Daphnella* schließt weiter die Arten *Salix kangensis* NAKAI und *Salix rorida* LAKESCHWITZ ein (Skvortsov und Zinovjev, 1999). Phytochemische Untersuchungen bzgl. des Vorkommens der Verbindung 6''-*O-trans-p*-Cumaroylisosalipurposid in diesen beiden Arten könnte äußerst aufschlussreiche Erkenntnisse zur Systematik der Weiden liefern.

3.5 Zusammenfassung

Es war möglich, in diesem Projekt sechs dimere PCs (B1, B2, B3, B4, B5, B7), drei trimere PCs (C1, Epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin, Catechin-(4 α →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin) und das quartäre PC Epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin zu isolieren und deren Strukturen aufzuklären.

Außerdem konnten als weitere PAs isoliert werden: 1x trimeres Flavan-3-ol (C₄₅H₃₈O₁₈), 4 x quartäres Flavan-3-ol (C₆₀H₅₀O₂₄), 7 x pentameres Flavan-3-ol (C₇₅H₆₂O₃₀), 2 x hexameres Flavan-3-ol (C₉₀H₇₄O₃₆), 1 x heptameres Flavan-3-ol (C₁₀₅H₈₆O₄₂). Jedoch konnte bei diesen nur die HRMS Messungen durchgeführt und der spezifische Drehwert $[\alpha]_{589}$ ermittelt werden, da die Ausbeuten für eine komplette Strukturaufklärung zu gering waren. Damit war es möglich, die Summenformel über die HRMS zu berechnen, und über die polarimetrischen Daten den Anteil 2,3-*cis*-konfigurierter Monomere (χ_{cis}) relativ zueinander abzuschätzen. Zusätzlich konnte in einem Cluster (S.d. S3.6 M4 D1) auf verbaute A-Typ-Fragmente und in zwei weiteren Clustern (S.d. S3.6 M4 D2, S.d. S3.6 M4 D3) auf PP-Anteile geschlossen werden. Diese drei Cluster konnten leider nicht weiter aufgereinigt werden.

Neben den PAs konnte auch noch das Chalkon 6''-*O-trans-p*-Cumaroylisosalipurposid isoliert werden.

Die vorliegende Arbeit war die erste systematische Untersuchung bzgl. der PAs in *Salix daphnoides* VILL. Die Verbindung 6''-*O-trans-p*-Cumaroylisosalipurposid wurde zum ersten Mal aus *S. daphnoides* isoliert.

3.6 Experimenteller Teil

3.6.1 Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland): MeOH p.a., MeOH für die Flüssigchromatographie, MeOH für die Spektroskopie, MeCN für die Flüssigchromatographie, FA, HOAc, HCl, Folin-Ciocalteu-Reagenz, getrocknetes Pyridin, Phloroglucinol zur Synthese, Acetanhydrid zur Synthese, H₂SO₄ p. A. 95 – 97%.

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland): Aceton p.a., 1-Butanol p.a., Benzylmercaptan, MeOH-*d*₄, TFA p.a., Pelargonidinchlorid, Delphinidinchlorid (Fluka, Neu-Ulm, Deutschland), Cyanidinchlorid ≥90% (Fluka), Vanillin (Fluka), p-Anisaldehyd, D-(-)-Salicin.

Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland): Tanninsäure für die Biochemie, wasserfreies Na₂CO₃, Catechin ≈CHR.

Deutero GmbH (Kastellaun, Deutschland): Chloroform-*d*₁, D₂O.

Extrasynthese (Lyon, Frankreich): Naringenin-7-*O*-glucosid.

Acros Organics (Geel, Belgien): EtOAc p.a.

Das H₂O für die Analysen wurde durch eine Astacus Filteranlage der Firma MembraPure GmbH (Henningsdorf/Berlin, Deutschland) aufbereitet.

3.6.2 Extraktionsverfahren

Die geschnittene Rinde von *Salix daphnoides* VILL. (Rückstellmuster-Nr. 1) wurde von Phyto-Lab GmbH & Co. KG (Artikelnummer: 174702; Vestenbergsgreuth, Deutschland) gestiftet. Ein Rückstellmuster wurde am Lehrstuhl Pharmazeutische Biologie der Universität Regensburg (Regensburg, Deutschland) eingelagert. Das Pflanzenmaterial wurde mit einer UZM 1 Ultrazentrifugalmühle der Firma Retsch GmbH (Haan, Deutschland) unter Verwendung des Siebeinsatzes mit der Bezeichnung 0.5 pulverisiert. Dieses Verfahren resultierte in 619,8 g pulverisiertem Drogenmaterial. Dieses Material wurde 1+1 (m/m) mit Seesand vermischt. Anschließend wurde diese Mischung erschöpfend mit 25 L MeOH 80% perkoliert. Dieser gewonnene Flüssigextrakt wurde zunächst an Rotationsverdampfern des Typs Laborota 4003 der Firma Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland) aufkonzentriert. Der zurückbleibende wässrige Extrakt wurde abschließend mit einer P10-85 Anlage von Dieter

Piatkowski – Forschungsgeräte (München, Deutschland) lyophilisiert. Das hier beschriebene Verfahren resultierte in 143,6 g Trockenextrakt (*S. d.*-Extrakt) mit einem Droge-Extrakt-Verhältnis von 4,32:1.

3.6.3 Dünnschichtchromatographie

DC wurde für die Fraktionskontrollen bei den unter Kapitel 3.6.4 und Kapitel 3.6.5 Trennverfahren und für Übersichts-DCs der finalen Fraktionen eines Aufreinigungsschritts verwendet.

Für alle Untersuchungen wurden DC-Platten Kieselgel 60 F₂₅₄ von Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Als Fließmittel kamen folgende Systeme zum Einsatz:

DC-System I: EtOAc/FA/H₂O (90+5+5 [V/V/V])

DC-System II: EtOAc/HOAc/FA/H₂O (100+11+11+26 [V/V/V/V])

Die Detektion erfolgte bei underivatisierten Platten bei Tageslicht, 254 nm und 366 nm. Außerdem kamen AA/H₂SO₄ (Detektion bei Tageslicht und 366 nm) und Vanillin/HCl (Detektion bei Tageslicht) als Sprühreagenzien zum Einsatz. Diese Sprühreagenzien wurden wie folgt hergestellt:

AA/H₂SO₄-Sprühreagenz:

Es wurden 0,50 mL AA in 10,0 mL HOAc gelöst. Anschließend wurden 85 mL MeOH und unter Eiskühlung 5,0 mL Schwefelsäure zugegeben. Die besprühten DC-Platten wurden bei 80°C ca. 5 – 10 min erhitzt, um die Derivatisierungsreaktion zu unterstützen.

Vanillin/HCl-Sprühreagenz:

Es wurde 1 g Vanillin in MeOH gelöst. Da die DC-Platten in zwei Schritten besprüht wurden, diente als zweiter Schritt das Besprühen mit rauchender HCl.

Tabelle 3-15 zeigt die R_F -Werte der Referenzen bei den im Folgenden beschriebenen Untersuchungen.

Tabelle 3-15: R_F -Werte der bei den Untersuchungen verwendeten Referenzen.

Referenz	R_F DC-System I	R_F DC-System II
Catechin	0,67	0,92
Naringenin-7- <i>O</i> -glucosid	0,33	0,69
D-(-)-Salicin	0,15	0,46

3.6.4 Säulenchromatographie an Sephadex® LH-20

Dieses Trennverfahren diente zur ersten Aufkonzentrierung von PA enthaltenden Fraktionen. Die Fraktionskontrolle wurde mit DC-System I durchgeführt. Um die Fraktionen besser definieren zu können, wurde zusätzlich ein Referenzmix aus D-(-)-Salicin, Naringenin-7-*O*-glucosid und Catechin auf jeder DC-Platte aufgetragen.

Sephadex® LH-20 (265 g) der Firma GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, Deutschland) wurde in EtOH 70% aufgeschlämmt und in eine Glassäule (Länge: 95 cm; Durchmesser: 3 cm) gegossen. Bereits während dieses Vorgangs wurde ein Fluss von 1 mL/min eingestellt.

Die Proben wurden in EtOH 70% gelöst und in drei Durchläufe aufgeteilt auf das Säulenbett aufgetragen (Beladungsmengen: Lauf 1 = 39,24 g, Lauf 2 = 39,15 g, Lauf 3 = 17,80 g). EtOH 70% diente als erstes Elutionsmittel, nachdem Catechin eluiert war, wurde bei den Vorfraktionierungsläufen auf Aceton 70% als Elutionsmittel gewechselt. Insgesamt wurden auf diese Weise drei Fraktionen gebildet (S1, S2, S3) wie in **Tabelle 3-16** gezeigt.

Die gesamte Fraktion S3 wurde abschließend erneut mit dem gleichen System bearbeitet. Zur Fraktionskontrolle wurde hier allerdings DC-System II mit dem Fließmittel EtOAc/HOAc/FA/H₂O (100+11+11+26 [V/V/V/V]) verwendet. Somit konnten acht neue Unterfraktionen gewonnen werden (S3.1-S3.8) vgl. dazu **Tabelle 3-17**.

Tabelle 3-16: Elutionsbereiche und Auswaagen der gewonnenen Fraktionen an Sephadex® LH-20.

	Fraktion S.d. S1		Fraktion S.d. S2		Fraktion S.d. S3	
	Elutions- bereich [mL]	Auswaage [g]	Elutions- bereich [mL]	Auswaage [g]	Elutions- bereich [mL]	Auswaage [g]
Lauf 1	0-990	30,06	990-2108	2,96	2108-Ende	2,76
Lauf 2	0-1300	30,82	1300-2142	1,60	2142-Ende	2,69
Lauf 3	0-1298	14,47	1298-1886	0,58	1886-Ende	1,14
Auswaagen [g]:	75,35		5,14		6,59	
Ausbeuten [%]:	78,3		5,3		6,9	
Gesamtausbeute [%]:	90,5					

Tabelle 3-17: Elutionsbereiche und Auswaagen nach Auftrennung der Fraktion S.d. S3 an Sephadex® LH-20.

Name der Fraktion	Elutionsbereich [mL]	Auswaage [mg]
S.d. S3.1	0-2200	689,2
S.d. S3.2	2200-2986	643,2
S.d. S3.3	2986-4154	748,2
S.d. S3.4	4154-4634	237,8
S.d. S3.5	4634-5104	194,6
S.d. S3.6	5104-6489	512,5
S.d. S3.7	6489-8264	415,8
S.d. S3.8	8264-Ende	3259,8

3.6.5 Säulenchromatographie an MCI-Gel® CHP20P

Dieses chromatographische Verfahren diente vor allem zur Auftrennung der verschiedenen Stereoisomere der in den Fraktionen S.d. S3.2 – S.d. S3.8 enthaltenen Flavan-3-ole.

Als stationäre Phase wurden 170 g MCI-Gel® CHP20P (Mitsubishi Chemical Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland) in MeOH 20% aufgeschlämmt. Damit wurde eine von beiden Seiten verschließbare Glassäule zur Flüssigchromatographie (Länge: 600 mm; Durchmesser: 25 mm) der Firma BESTA-Technik für Chromatographie GmbH (Wilhelmsfeld, Deutschland) befüllt. Nachdem diese gepackte Säule in einen Spot Liquid Chromatography Flash Automaten (Armen Instrument, Saint-Avé, Frankreich) eingebaut war, wurde die Chromatographie mit einem konstanten Fluss von 7,5 mL/min mit dem in **Tabelle 3-18** beschriebenen Gradienten durchgeführt (Eluent A: MeOH 20%, Eluent B: MeOH 50%). Die beiden letzten Schritte dienten zum stufenweisen Ausspülen der Säule für jeweils 90 min. Die Fraktionskontrolle wurde mit dem in Kapitel **3.6.3** beschriebenen DC-System II durchgeführt. Jede Fraktion aus der Sephadex® LH-20-Fraktionierung (S.d. S3.1 – S.d. S3.7, vgl. Kapitel **3.6.4**) wurde jeweils komplett unter Startbedingungen in mobiler Phase gelöst und in einem Lauf chromatographisch aufgetrennt.

Tabelle 3-18: Gradient zur Auftrennung an MCI-Gel® CHP20P.

t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	0
10	100	0
360	0	100
360	Wechsel auf MeOH 75%	
450	Wechsel auf MeOH	

3.6.6 Präparative HPLC-Methoden

Die hier beschriebenen präparativen HPLC-Methoden dienen zur finalen Aufreinigung der aus den Chromatographieläufen an MCI-Gel® CHP20P gewonnenen Fraktionen. Dabei zeigen **Tabelle 3-19 - 3-24** die Gradienten der einzelnen HPLC-Systeme.

HPLC-Anlage I:	Binäre präparative Varian ProStar HPLC mit DAD und manuellem Injektor (Varian Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland)
HPLC-Anlage II:	Binäre Agilent Infinity 1260 HPLC mit 1260 Agilent DAD, 1260 Agilent Fraktionskollektor und 1260 Agilent manual injector (Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG, Waldbronn, Deutschland)
HPLC-Säule I:	XDB-C18 PrepHT 21.2 × 250 mm 5-Micron Säule mit Vorsäule (Agilent)
HPLC-Säule II:	Uptisphere DIOL 6 µm 250 × 21.2 Prep-LC-column mit Vorsäule (Interchim, Montluçon Cedex, Frankreich)
HPLC-System A:	HPLC-Anlage I HPLC-Säule I Eluent A: H ₂ O; Eluent B: MeCN; Fluss: 17 mL/min;

Tabelle 3-19: Gradient des präparativen HPLC-Systems A.

t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	90	10
18	90	10
19	25	75
21	25	75
23	90	10
28	90	10

HPLC-System B: HPLC-Anlage II

HPLC-Säule I

Eluent A: H₂O; Eluent B: MeCN; Fluss: 25,5 mL/min;

Tabelle 3-20: Gradient des präparativen HPLC-Systems B.

t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	95	5
13	85	15
18	85	15
20	0	100
25	0	100
27	95	5
30	95	5

HPLC-System C: HPLC-Anlage II

HPLC-Säule II

Eluent A: MeCN; Eluent B: MeOH 95%; Fluss: 15 mL/min;

Tabelle 3-21: Gradient des präparativen HPLC-Systems C.

t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	95	5
5	95	5
25	70	30
26	95	5
30	95	5

HPLC-System D: HPLC-Anlage II

HPLC-Säule II

Eluent A: MeCN; Eluent B: MeOH 95%; Fluss: 10 mL/min;

Tabelle 3-22: Gradient des präparativen HPLC-Systems D.

t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	95	5
5	95	5
25	70	30
26	95	5
30	95	5

HPLC-System E: HPLC-Anlage II

HPLC-Säule I

Eluent A: H₂O; Eluent B: MeCN; Fluss: 17 mL/min;

Tabelle 3-23: Gradient des präparativen HPLC-Systems E.

t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,00	75,0	25,0
2,50	75,0	25,0
8,75	37,5	62,5
10,00	0,0	100,0
13,75	0,0	100,0
15,00	75,0	25,0
19,00	75,0	25,0

HPLC-System F: HPLC-Anlage II

HPLC-Säule I

Eluent A: H₂O; Eluent B: MeCN; Fluss: 15 mL/min;

Tabelle 3-24: Gradient des präparativen HPLC-Systems F.

t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	50	50
2	50	50
30	25	75
35	0	100
40	0	100
41	50	50
45	50	50

3.6.7 Peracetylierung dimerer Procyanidine

Diese Derivatisierungsreaktion wird angewendet, um die freie Rotation bei dimeren PCs zu unterbinden. Außerdem war für einige Verbindungen der eindeutige Strukturnachweis nur über den Abgleich der ¹H-NMR-Spektren mit der Literatur möglich.

Dazu wurde zu den Proben je 0,5 mL Pyridin und Acetanhydrid pipettiert. Die zugehörigen Einwaagen und Ausbeuten sind in den jeweiligen Ergebnis-Kapiteln der isolierten PCs zu finden. Diese Ansätze wurden unter Lichtausschluss und moderatem Schütteln auf einem KS/B Laborschüttler (Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland) für 24 h inkubiert. Diese Reaktion ist in **Abb. 3-38** gezeigt. Durch die Zugabe von gekühltem H₂O wurde das Reaktionsprodukt ausgefällt. Um die Präzipitation abzuschließen, wurde für weitere 12 h in einem explosionsgeschütztem Laborkühlschrank KSEX 360-VWRI (Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland) inkubiert. Das Produkt wurde nun drei Mal mit H₂O unter Verwendung eines Glasfiltertiegels, einer Absaugflasche und einer Wasserstrahlpumpe gewaschen. Abschließend wurde das jeweilige Peracetat in Aceton gelöst und durch den Glasfiltertiegel eluiert. Diese Lösungen wurden an einem Laborota 4003 Rotationsverdampfer (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG) zur Trockene eingedampft.

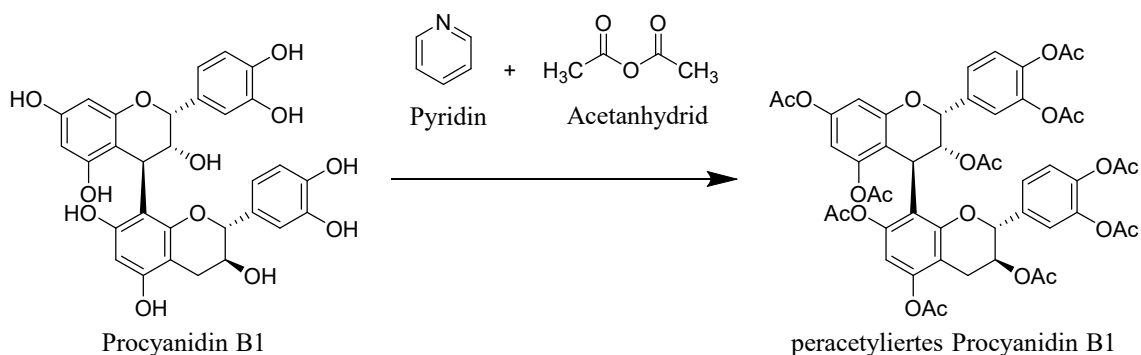


Abb. 3-38: Reaktionsgleichung der Peracetylierungsreaktion am Beispiel PC B1.

3.6.8 NMR-spektroskopische Verfahren

Die NMR-spektroskopischen Experimente dienen zur Strukturaufklärung der isolierten Substanzen. Dabei wurde sowohl auf 1D- (^1H , ^{13}C) als auch auf 2D-Verfahren ($[\text{}^1\text{H}-\text{}^1\text{H}]$ -COSY, $[\text{}^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ -HSQC, $[\text{}^1\text{H}-^{13}\text{C}]$ -HMBC, $[\text{}^1\text{H}-\text{}^1\text{H}]$ -NOESY, $[\text{}^1\text{H}-\text{}^1\text{H}]$ -ROESY) zurückgegriffen. Alle chemischen Verschiebungen (δ_{H} und δ_{C}) wurden dabei in ppm und die Kopplungskonstanten J in Hz angegeben.

Alle freiphenolischen Proben wurden in $\text{MeOH}-d_4$ und die peracetylierten PCs in Chloroform- d_1 gelöst. Alle Spektren wurden über die entsprechenden Lösungsmittelsignale der jeweiligen nichtdeutერიerten Lösungsmittelnrückstände kalibriert.

Um auswertbare NMR-Spektren zu generieren, mussten einige Verbindungen bei niedrigerer Temperatur (233 K, 253 K) vermessen werden. Dadurch war es möglich, die Rotationsisomerie einzuschränken.

Die Messungen wurden an den folgenden Geräten durchgeführt:

Tieftemperaturmessungen: AVANCE III HD NMR (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA), 400,13 MHz (^1H -NMR) und 100,63 MHz (^{13}C -NMR)

Messungen bei RT: AVANCE III 600 NMR mit 5 mm TCI CryoProbe (Bruker Corporation), 600,25 MHz (^1H -NMR) und 150,95 MHz (^{13}C -NMR)

Vermessung der Peracetate: AVANCE 300 (Bruker Corporation), 300,13 MHz (^1H -NMR) und 75,48 MHz (^{13}C -NMR)

3.6.9 Massenspektrometrie

Die für die isolierten Verbindungen gemessenen ESI-HRMS-Spektren und die daraus ersichtlichen Fragmente bzw. Pseudomolekülonen dienten zur Errechnung der Summenformeln. Dazu kam ein Quadrupol-Time of Flight Q-TOF 6540 UHD (Agilent) Massenspektrometer mit einer Dual-ESI-Ionenquelle (Agilent) zum Einsatz.

3.6.10 Circular dichroismus

Über die CD-Spektren war es möglich, die Konfiguration am jeweiligen C-4-Atom, der an dieser Position substituierten Flavan-3-ol-Einheiten, zu bestimmen.

Die Messungen wurden an einem J-715 Spectropolarimeter der Firma JASCO Deutschland GmbH (Gross-Umstadt, Deutschland) bei einer Temperatur von 22 °C durchgeführt. Die Proben wurden in MeOH für die Spektroskopie zu einer Konzentration von 175 µmol/L gelöst und in eine 1 mm Quartzküvette überführt. Der Messbereich von 200-400 nm wurde in 0,5 nm Schritten mit einer Geschwindigkeit von 200 nm/min abgefahren. Falls sich die Konzentration als zu hoch herausstellte, wurde eine 1+4 [V/V] Verdünnung der entsprechenden Lösung vorgenommen. Das endgültige Spektrum wurde aus zehn Messzyklen gemittelt und über den Savatky-Golay Algorithmus mit einer convolution width von 15 geglättet.

3.6.11 Polarimetrische Untersuchungen

Um die Isolate bzgl. Ihrer optischen Aktivität zu beurteilen, wurde der spezifische Drehwert $[\alpha]_{589}$ ermittelt. Diese Stoffkonstante diente auch zum Abgleich mit in der Literatur beschriebenen Werten.

Die Drehwerte wurden an einem UniPol L 1000 Polarimeter der Firma Schmidt + Haensch GmbH & Co. (Berlin, Deutschland) mit einer Konzentration von 0,1% bei 589,30 nm in einem Mikromessrohr (Länge: 50 mm; Volumen: 0,55 mL) ermittelt. Die freiphenolischen Substanzen wurden für diese Untersuchung in MeOH für die Spektroskopie und die peracetylierten Reaktionsprodukte in Aceton p.a. gelöst. Der angegebene Wert $[\alpha]_{589}$ ist der Mittelwert aus zehn Messungen.

3.6.12 Elementaranalyse

Die Experimente zur Elementaranalyse der Verbindung S.d. S2 M2 R1 (vgl. Kapitel **3.2.2**) wurden in der Zentralen Analytik der Universität Regensburg durchgeführt. Dazu wurde die Probe im Triplikат vermessen. Die Analysen wurden auf einer MT5 Mikrowaage (Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland) eingewogen und anschließend die C- und H-Anteile mit einem vario MICRO cube (Elementar Analysensysteme GmbH, Langenselbold, Deutschland) ermittelt. Die Angabe des Ergebnisses erfolgte als Mittelwert \pm SD.

4 Charakterisierung zweier mit Proanthocyanidinen angereicherten Fraktionen aus *Salix daphnoides* VILL.

4.1 Hintergrund

Bei dieser Fragestellung galt es, mögliche chemische Unterschiede im Strukturaufbau zwischen zwei vermeintlichen polymeren PAs herauszuarbeiten. In **Abb. 4-1** ist dazu das Elutionsmuster an Sephadex® LH-20 gezeigt. Die Methode zu dieser Säulenchromatographie ist in Kapitel 3.6.4 detailliert beschrieben. Ein ungewöhnliches Resultat dieses Trennverfahrens bestand in der sehr frühen Elution mutmaßlicher polymerer PAs. Sichtbar war dies durch eine rote Färbung mit dem Vanillin/HCl-Sprühreagenz auf den Kieselgel 60 F₂₅₄ Kontroll-DCs und dem Verbleib auf der Startlinie ($R_F = 0$). Diese „ungewöhnlichen“ Verbindungen wurden in der Elutionsreihenfolge bereits gleichzeitig mit den monomeren Flavan-3-olen detektiert. Die „regulären“ polymeren PAs zeigten auf den DCs identische Eigenschaften. Allerdings wurden diese erst nach einem Fließmittelwechsel auf Aceton 70% von der Säule gespült. Diese Beobachtung legte nahe, dass diese „ungewöhnlichen“ PAs strukturell unterschiedliche Merkmale aufweisen sollten.

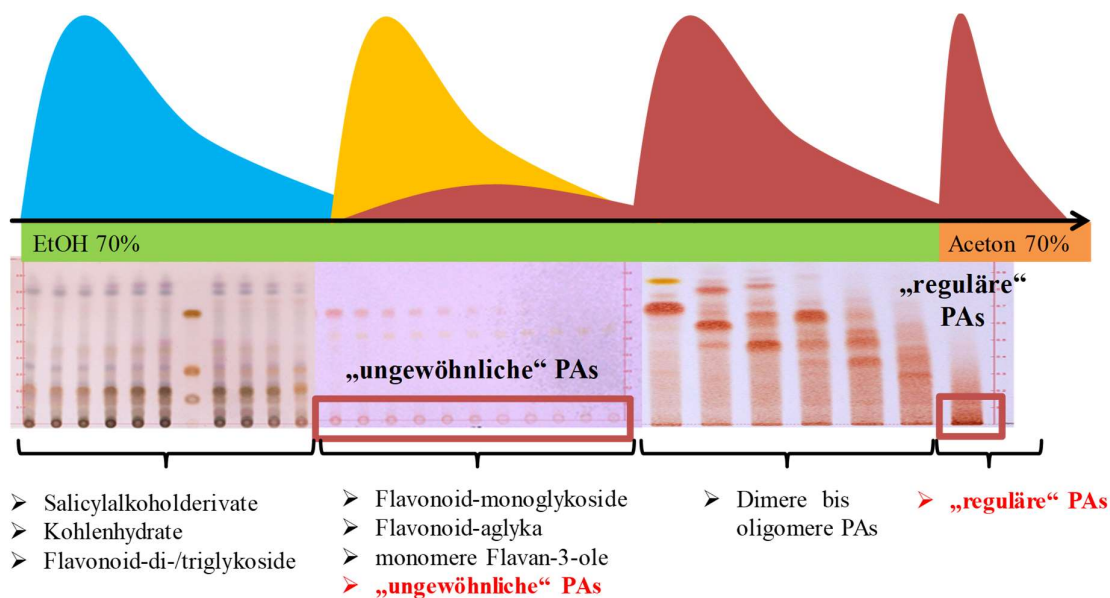


Abb. 4-1: Schematische Darstellung des Elutionsmusters des *S. d.*-Extraktes mit den zugehörigen Auszügen aus der Fraktionskontrolle an Sephadex® LH-20. DC-Platten: Kieselgel 60 F₂₅₄; DC-Detektion: AA/H₂SO₄ (linkes DC), Vanillin/HCl (mittleres und rechtes DC); Fließmittel: EtOAc/FA/H₂O (90+5+5 [V/V/V], linkes und mittleres DC), EtOAc/HOAc/FA/H₂O (100+11+11+26 [V/V/V/V], rechtes DC).

4.2 Aufarbeitung der beiden Fraktionen

4.2.1 Anreicherungsverfahren

Die ursprüngliche Strategie lag in einem Isolierungsversuch dieser „ungewöhnlichen“ PAs. Dabei wurden mit freundlicher Unterstützung der Firma Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland) mehrere analytische HPLC-Säulen (EC 250/4,6 Nucleodur 100-5 CN-RP, EC 250/4,6 Nucleodur PFP (5 µm)) und verschiedene DC-Platten (ALUGRAM® Nano-SIL CN/UV₂₅₄, ALUGRAM® Nano-SIL Diol/UV₂₅₄, ALUGRAM® Nano-SIL RP-2/UV₂₅₄, ALUGRAM® Nano-SIL NH₂/UV₂₅₄) zu Testzwecken zur Verfügung gestellt, um deren Trennleistung in Bezug auf diese Problemstellung zu evaluieren. Des Weiteren wurde auch die Eignung von RP-18 und Cellulose untersucht. Leider führte keine der aufgeführten stationären Phasen zum gewünschten Trennerfolg. Aus diesem Grund erfolgte eine Anreicherung der PAs in der Fraktion S.d. S2 via CPC in einem zweiphasigen 1-Butanol/H₂O-System (vgl. Kapitel 4.5.2). Dabei wurde ein großer Teil der anderen Phenole zunächst mit 1-Butanol eluiert, wodurch sich die „ungewöhnlichen“ PAs in der H₂O-Phase angereichert fanden. Die „regulären“ PAs waren bereits in der Fraktion S.d. S3.8 (vgl. Kapitel 3.6.4) ausreichend konzentriert. Das Aufarbeitungsschema, das zu den beiden Fraktionen führte, ist in **Abb. 4-2** zu finden. Durch eine vergleichende Charakterisierung sollten mögliche Unterschiede zwischen den beiden Fraktionen erarbeitet werden.

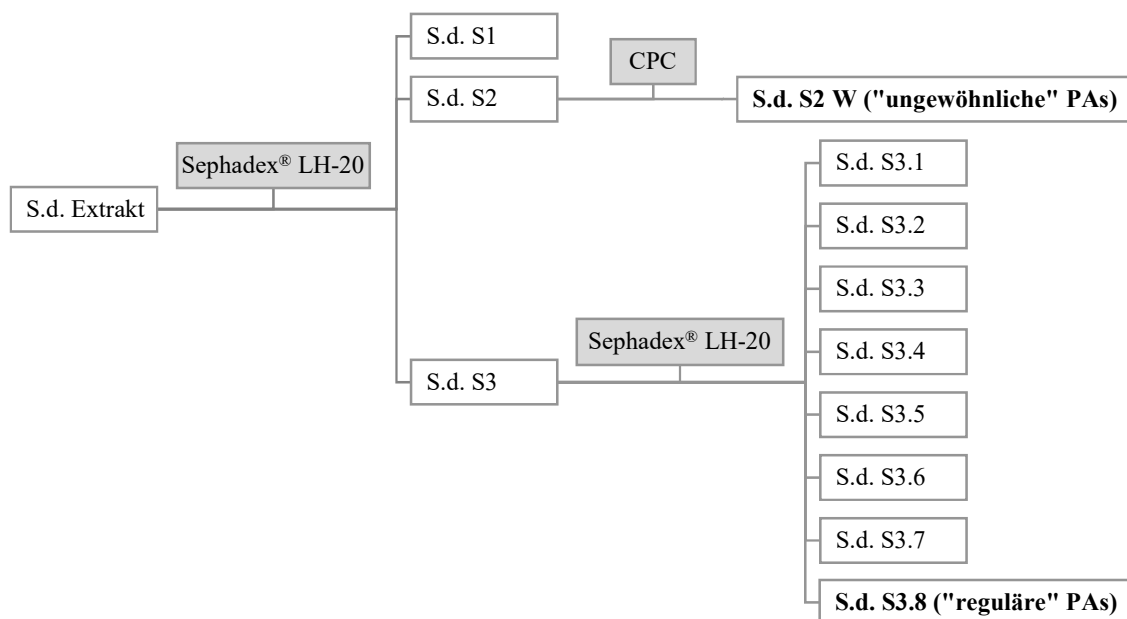


Abb. 4-2: Aufarbeitungsschema für die beiden mit PAs angereicherten Fraktionen. Die Fraktionen S.d. S1 bis S.d. S3 und S.d. S3.1 bis S.d. S3.8 wurden über Chromatographie an Sephadex® LH-20 gewonnen. Die finale Aufkonzentrierung der PAs in der Fraktion S.d. S2 W fand via CPC statt. Die PA-reichen Fraktionen, die vergleichend charakterisiert werden sollten sind fettgedruckt.

4.2.2 Charakterisierung und Vergleich der beiden Fraktionen

Da eine Isolierung einzelner Verbindungen nicht möglich war, mussten die zu vergleichenden Fraktionen (vgl. Kapitel 4.1 und 4.2.1) als solche charakterisiert werden. Dazu sollten die Resultate mehrerer verschiedener Methoden eine abschließende Beurteilung über mögliche strukturelle Unterschiede ermöglichen.

Zunächst war es wichtig, den Gesamtgerbstoffgehalt in den beiden Fraktionen zu bestimmen. Dabei wurde die Methode 2.8.14 des Ph. Eur. (2.8.14, 2015) mit leichten Modifikationen genutzt (vgl. Kapitel 4.5.3). Dieses Verfahren nutzt die Reduzierung des Folin-Ciocalteu-Reagenzes zu blau gefärbten Mischoxiden (Wolframblau) (Glasl H., 1983). **Abb. 4-3** zeigt die Reaktionsgleichung für diese Reduktion.

Wie in Kapitel 4.5.3 wurden hier die Gehalte auf Tanninsäure (vgl. **Abb. 4-11** in Kapitel 4.5.3) als 100%-Kontrolle bezogen. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten. Die Gesamtgerbstoffgehalte beliefen sich auf $66,5\% \pm 0,5\%$ bei den „ungewöhnlichen“ PAs und auf $84,0\% \pm 2,0\%$ bei den „regulären“ PAs. Damit sind unter Anwendung dieser Konventionsmethode in beiden Fraktionen die Gerbstoffe die maßgeblichen Inhaltsstoffe.

Der nächste Schritt war die Bestimmung des PC-Gehalts nach der Monographie „Weißdornfrüchte“ im Ph. Eur. 7.0 (Weißdornfrüchte, 2011). Dabei werden die PAs im sauren Milieu oxidativ gespalten (HCl/O_2 -Spaltung). Die jeweils unterste Einheit wird als das jeweilige Flavan-3-ol abgespalten, die oberen Einheiten in Form ihrer korrespondierenden Anthocyanidine. Der exakte Versuchsaufbau und das Reaktionsprinzip sind in Kapitel 4.5.6 erläutert. Nach diesem Assay zeigten die „ungewöhnlichen“ PAs einen Gehalt von $57,9\% \pm 2,8\%$ und die „regulären“ PAs von $78,2\% \pm 9,7\%$, jeweils berechnet als Cyanidinchlorid. Auch bei diesen Ergebnissen stellen sich die PAs als Hauptkomponenten in beiden Fraktionen heraus. In **Tabelle 4-1** sind die Resultate aus den beiden durchgeführten Konventionsmethoden zusammengefasst.

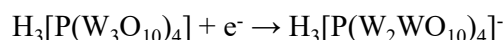


Abb. 4-3: Reaktionsgleichung für die Reduktion des Folin-Ciocalteu-Reagenz zu Wolframblau.

Tabelle 4-1: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Konventionsmethoden zur Gesamtgerbstoffbestimmung und der PC-Bestimmung.

Methode	Gehalt [% \pm SD%]	
	„ungewöhnliche“ PAs	„reguläre“ PAs
Gesamtgerbstoffbestimmung	66,5 \pm 0,5	84,0 \pm 2,0
PC-Bestimmung	57,9 \pm 2,8	78,2 \pm 9,7

Um erste Informationen bzgl. struktureller Unterschiede zu erhalten, wurden die Anthocyanidine nach dieser HCl/O₂-Spaltung mit dem in Kapitel 4.5.6 beschriebenen HPLC-System VII und UHPLC-System II erfasst. Zu dieser Analytik ist in **Abb. 4-4** exemplarisch jeweils ein HPLC-Lauf gezeigt. Die Flächen des Delphinidins, Cyanidins und Pelargonidins wurden summiert und jedes Anthocyanidin zu dieser Gesamtfläche in Relation gesetzt. Die in Triplikaten generierten Ergebnisse sind in **Tabelle 4-2** zusammengefasst. Durch diese Resultate wird zunächst deutlich, dass es sich sowohl bei den „regulären“ als auch bei den „ungewöhnlichen“ PAs nicht um reine PCs handelt. Hier konnten sowohl Prodelphinidin- und Propelargonidinanteile detektiert werden. Mit 4,3% versus 0,8% sind in den „regulären“ PAs deutlich mehr trihydroxylierte Flavan-3-ole (wie z.B. Gallocatechin) verbaut. Monohydroxylierte Flavan-3-ole (wie z.B. Afzelechin) sind mit 1,4% in beiden PAs gleichermaßen vertreten. Hauptsächlich sind jedoch in beiden Fällen dihydroxylierte Flavan-3-ole (wie z.B. Catechin) klar die dominierenden Monomere.

Tabelle 4-2: Anteile der jeweils aus den „ungewöhnlichen“ und „regulären“ PAs freigesetzten Anthocyanidine.

Fraktion	Anteil [% \pm SD%]		
	Delphinidin	Cyanidin	Pelargonidin
„reguläre“ PAs	4,3 \pm 0,1	94,3 \pm 0,2	1,4 \pm 0,1
„ungewöhnliche“ PAs	0,8 \pm 0,0	97,8 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1

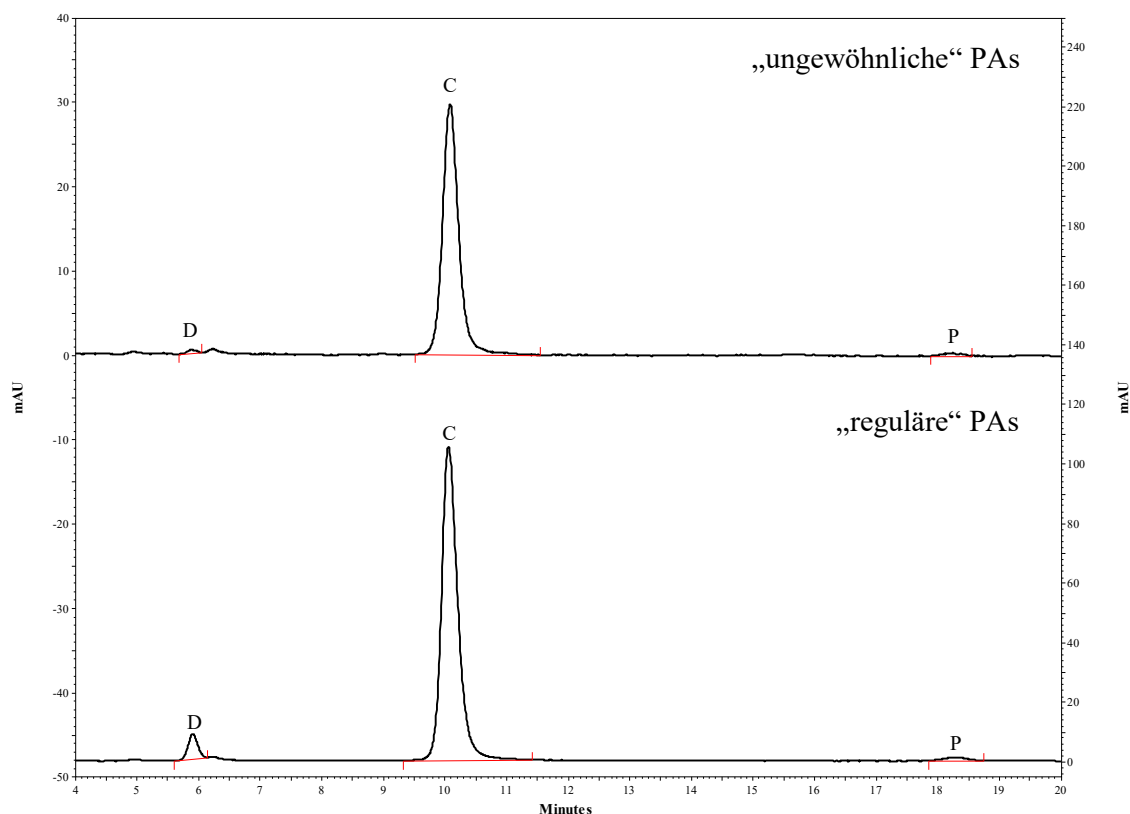


Abb. 4-4: Chromatogramme der Anthocyanidine nach der sauren oxidativen Spaltung der „ungewöhnlichen“ und „regulären“ PAs bei einer Wellenlänge von $\lambda = 525$ nm. Die Buchstaben kennzeichnen die jeweiligen Anthocyanidine: D = Delphinidin, C = Cyanidin, P = Pelargonidin. Die linke y-Achse gibt die Absorption zum Chromatogramm der „ungewöhnlichen“ und die rechte y-Achse zu dem der „regulären“ PAs an.

Es war unmöglich die Molekülmasse der „ungewöhnlichen“ PAs über HPLC-ESI-HRMS zu ermitteln, da diese Strukturen nicht ionisiert werden konnten. Aus diesem Grund wurde eine quantitative Spaltung der PAs in Gegenwart von Benzylmercaptan im essigsauren durchgeführt. Der zugesetzte Reaktand fungiert dabei als Nukleophil und verhindert durch eine Addition der Thiolgruppe an C-4 der vorher an dieser Position substituierten Einheiten eine Oxidierung zu den entsprechenden Anthocyanidinen. Die zugehörige Methodik ist in Kapitel 4.5.5 genau beschrieben und die zugehörigen Chromatogramme sind in **Abb. 4-5** gezeigt. Diese Analytik wurde mit der Fraktion S.d. S3.8 in einem Hexaplikat und mit Fraktion S.d. S2 W in einem Quadruplikat durchgeführt. Qualitativ war die Detektion eines Fragments m/z 427,0862 $[M-H]^-$ in der Probe mit den „regulären“ PAs (Peak 4*) sehr interessant. Für dieses Fragment konnte die Summenformel $C_{22}H_{20}O_7S$ (calcd. m/z 427.0857) über die HRMS errechnet werden, was auf den Thioether eines Gallocatechins oder Epigallocatechins schließen lässt. Für ein weiteres interessantes Fragment m/z 395,0963 $[M-H]^-$ in beiden untersuchten PAs

(Peak 10) wurde die Summenformel $C_{22}H_{20}O_5S$ (calcd. m/z 395.0959) errechnet. Das lässt auf einen Thioether einer Afzelechin-, bzw. Epiafzelechineinheit, schließen. Diese beiden herausstechenden Fragmente untermauerten die Ergebnisse aus den HPLC-Analysen der durch die HCl/O_2 -Spaltung freigesetzten Anthocyanidine. Die Peaks 1 und 2 stellen die endständigen, bzw. untersten, Einheiten dar. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich dabei um die im B-Ring dihydroxylierten Flavan-3-ole Catechin und Epicatechin. Alle anderen detektierten Peaks sind Thioether von verlängernden Einheiten. Der Unterschied der mDP dieser Fraktionen fällt deutlich aus. Die „ungewöhnlichen“ PAs zeigten einen mDP von $4,9 \pm 0,1$ und die der „regulären“ PAs einen mDP von $11,8 \pm 0,1$.

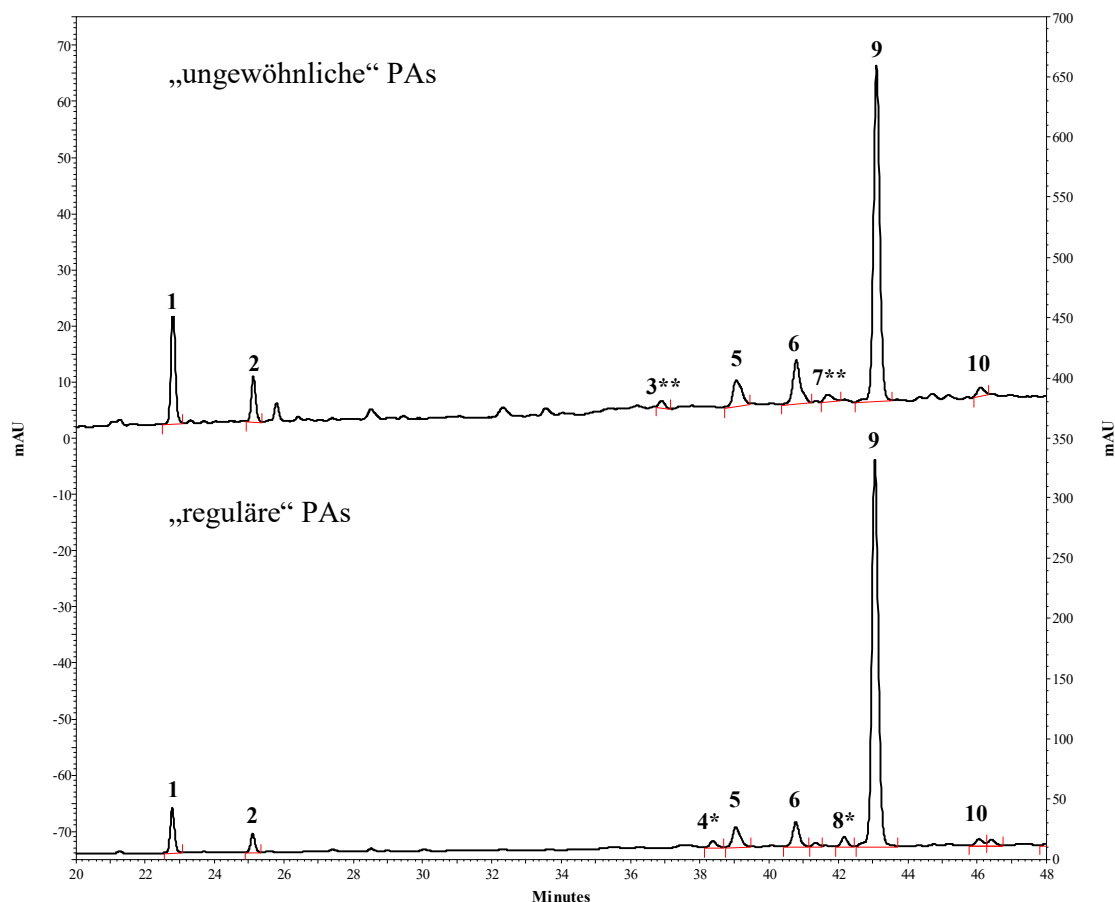


Abb. 4-5: Chromatogramme der Thiolyseprodukte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm. Die linke y-Achse gibt die Absorption im Chromatogramm der „ungewöhnlichen“ und die rechte y-Achse die in dem der „regulären“ PAs an. Mit „*“ gekennzeichnete Peaks wurden nur bei den „regulären“ PAs und mit „**“ gekennzeichnete Peaks nur bei den „ungewöhnlichen“ PAs detektiert. Peaks 1 und 2 entsprechen den terminalen (untersten) Einheiten, Peaks 3 - 10 sind die Thioether der verlängernden Einheiten.

Detailliertere Informationen sollten Untersuchungen der ^{13}C -NMR-Spektren liefern. Dabei handelt es sich um eine etablierte Technik zur Charakterisierung solcher PA-reichen Fraktionen (Czochanska et al., 1980; Eberhardt und Young, 1994; Jürgenliemk et al., 2007; Newman et al., 1987). Auf diesem Weg können Rückschlüsse auf den Hydroxylierungsgrad der B-Ringe und auf das Verhältnis von 2,3-*cis* zu 2,3-*trans* konfigurierten Monomeren gezogen werden. Außerdem ist auch eine Abschätzung des mDP über die ^{13}C -NMR-Spektren möglich. In **Abb. 4-6** sind die ^{13}C -NMR-Spektren der „regulären“ (oben, rot) und der „ungewöhnlichen“ PAs (unten, blau) zu sehen. Die Abschätzung des mDP war hier über das Integral der mit „K“ (C-4 der jeweils untersten Einheit) und „J“ (C-4 der oberen Einheiten) gekennzeichneten Signale möglich. Dabei wurde das Integral für das Signal „K“ auf eins kalibriert. Damit integrierte sich das Signal „J“ im Spektrum der „regulären“ PAs auf elf. Somit sind

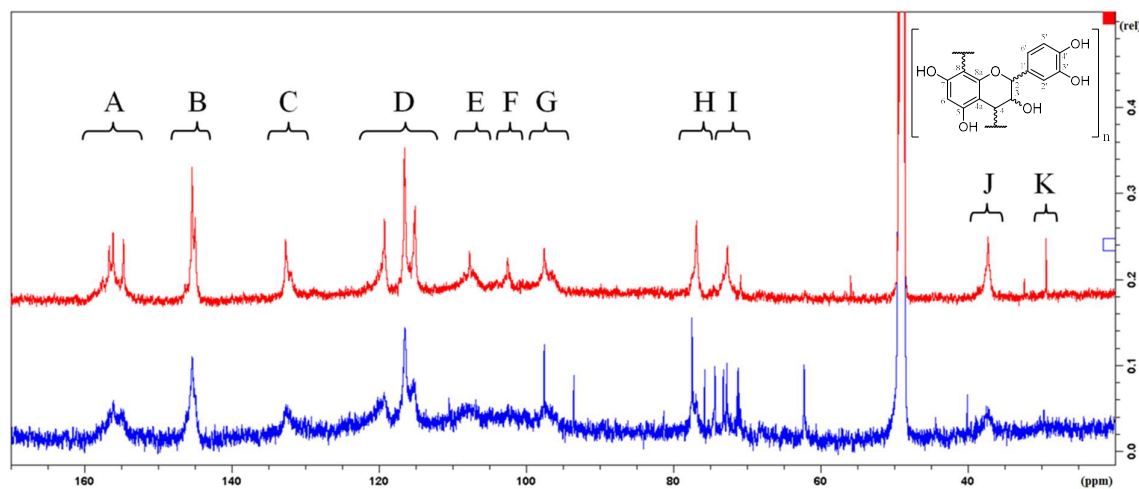


Abb. 4-6: ^{13}C -NMR-Spektren der „regulären“ (oben, rot) und der „ungewöhnlichen“ (unten, blau) PAs. Im Folgenden die Zuordnung der Signale: A (δ 152–160 ppm): C-5, C-7, C-8a; B (δ 144–147 ppm): C-3', C-4'; C (δ 131–134 ppm): C-1'; D (δ 114–123 ppm): C-2', C-5', C-6'; E (δ 106–110 ppm): substituierte C-6 und C-8; F (δ 101–104 ppm): C-4a; G (δ 95–99 ppm): unsubstituierte C-6 und C-8; H (δ 76–78 ppm): C-2; I (δ 71–74 ppm): C-3; J (δ 36–39 ppm): C-4 der verlängernden (oberen) Einheiten; K (δ 29–30 ppm): C-4 der endständigen (untersten) Einheiten. Die NMR-Messungen wurden bei RT mit einem AVANCE III 600 NMR-Spektrometer mit 5 mm TCI CryoProbe (^{13}C -NMR: 150,95 MHz) in einem $\text{MeOH-}d_4/\text{D}_2\text{O}$ -Gemischs (7+3, [V/V]) gelöst durchgeführt.

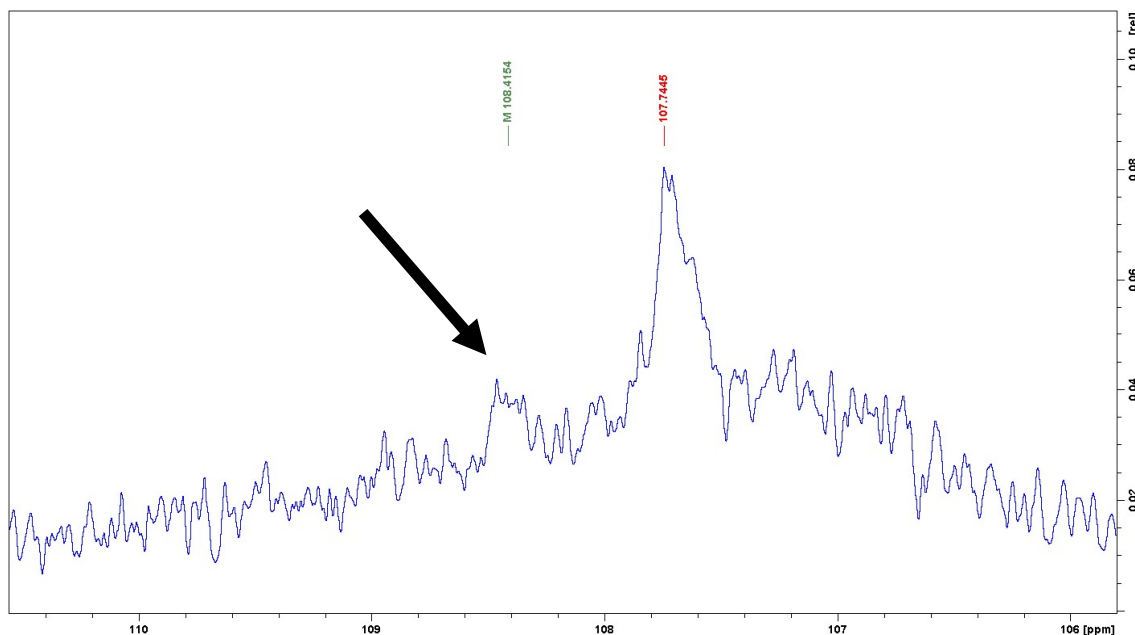


Abb. 4-7: Signal bei δ 108.4 ppm im ^{13}C -Spektrum der „regulären“ PAs. Dadurch wird die Anwesenheit von monomeren Flavan-3-olen mit trihydroxylierten B-Ringen angezeigt.

durchschnittlich zwölf C-4-Kohlenstoffe in einem Molekül verbaut, was einen mDP von ca. zwölf bedeutet. Dieses Ergebnis ist kongruent zu dem aus dem thiolytischen Abbau der „regulären“ PAs. Diese Herangehensweise war bei den „ungewöhnlichen“ PAs leider nicht möglich, da das Signal „K“ in deren NMR-Spektrum nicht ausreichend ausgeprägt war.

In **Abb. 4-7** ist ein schwaches Signal bei δ 108,4 ppm bei den „regulären“ PAs gezeigt. Dieses Signal zeigt eine typische chemische Verschiebung für C-2' und C-6' von 3',4',5'-trihydroxylierten Flavan-3-olen. Das unterstreicht das Ergebnis aus der HCl/O₂-Spaltung, bei der Delphinidin aus den „regulären“ PAs gebildet wurde.

Durch diese NMR-Untersuchung kann aber auch das Verhältnis von 2,3-*trans* zu 2,3-*cis* konfigurierten Monomeren abgeschätzt werden. Der dafür relevante Ausschnitt von δ 76-85 ppm aus den ^{13}C -NMR-Spektren ist in **Abb. 4-8** dargestellt. Dabei stellt der Signalcluster von δ 76-78 ppm die C-2 Kohlenstoffatome von 2,3-*cis* konfigurierten Einheiten dar. Da im Bereich von δ 82-84 ppm keine Signale detektiert wurden, die die C-2-Kohlenstoffatome der 2,3-*trans* konfigurierten Monomere anzeigen würden, schien die 2,3-*cis* Konfiguration in beiden PAs vorherrschend zu sein.

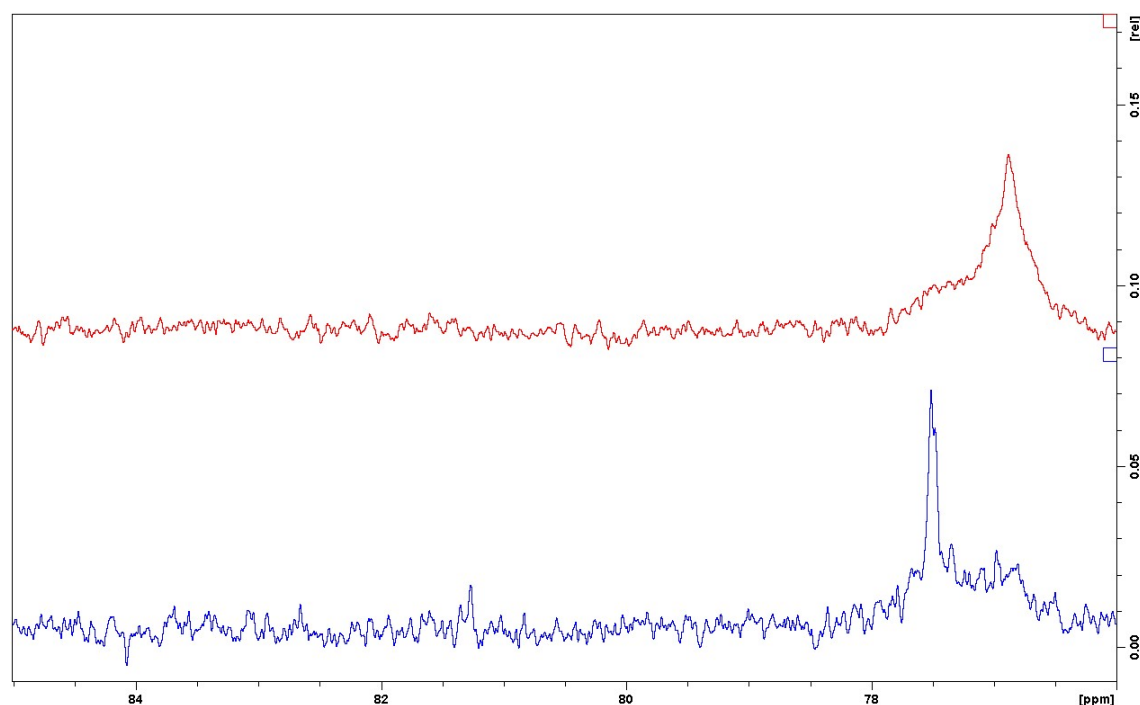


Abb. 4-8: Der Ausschnitt von 76–85 ppm der ¹³C-NMR-Spektren der „regulären“ (oben, rot) und der „ungewöhnlichen“ (unten, blau) PAs. Der Bereich von δ 76–78 ppm zeigt das C-2 von 2,3-*cis* konfigurierten Flavan-3-ol-Einheiten. Die Signale von 2,3-*trans* konfigurierten monomeren Einheiten würden zwischen δ 82–84 ppm erscheinen.

Hoffnung, dass ein struktureller Unterschied gefunden worden sein könnte, machten die scharfen Signale zwischen δ 62–76 ppm im ¹³C-Spektrum der „ungewöhnlichen“ PAs (vgl. **Abb. 4-6**). Diese Signale würden demnach Zuckersubstituenten indizieren. Um dieser These nachzugehen, wurde ein partieller Phloroglucinolabbau durchgeführt (vgl. Kapitel 4.5.4). Dabei sollten möglichst große Bruchstücke unter möglichst schonenden Bedingungen erzeugt werden, die immer noch substituiert sind und ionisiert werden können. Allerdings konnte kein Fragment über HPLC-ESI-HRMS detektiert werden, welches auf einen passenden Substituenten schließen ließ, der diese Signale erklären könnte. Mit großer Wahrscheinlichkeit resultierten die Signale zwischen δ 62–76 ppm von Verunreinigungen, da es sich hierbei ja nur um eine mit PAs angereicherte Fraktion handelte.

Die bereits durch die ¹³C-NMR-Untersuchungen gezeigte deutliche Dominanz von 2,3-*cis* konfigurierten Einheiten sollte noch durch eine polarimetrische Untersuchung untermauert werden. Grundlage für diese Abschätzung des Verhältnisses der Konformere ist die Ermittlung des $[\alpha]_{578}$. Da in der Arbeitsgruppe kein Polarimeter zur Verfügung stand, bei dem bei 578 nm gemessen werden kann, führte dankenswerterweise Herr Dr. Frank Petereit (Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie, WWU Münster, Deutschland) diese Messungen durch.

Porter (1989) liefert dazu die hier angewendete Formel für die Abschätzung des Anteils der 2,3-*cis*-Konformere (χ_{cis}) in diesen Fraktionen (vgl. Kapitel 4.5.9). Diese Methode ist auf die Arbeit von Czochanska et al. (1980) zurückzuführen. Die regulären PAs zeigten ein χ_{cis} von 89,9%. Damit ist auch hier das Ergebnis aus den ^{13}C -NMR-Untersuchungen bestätigt, dass 2,3-*cis* konfigurierte Monomere in diesen PAs vorherrschend sind. Bei den „ungewöhnlichen“ PAs konnte diese Analytik nicht durchgeführt werden, da die entsprechende Lösung eine zu hohe Eigenfärbung (tiefbraun) aufwies. Damit war die Absorption des Lichts zu groß, so dass kein Drehwinkel bestimmt werden konnte.

In **Abb. 4-9** und **Abb. 4-10** sind die CD-Spektren der Fraktion S.d. S2 W, bzw. S.d. S3.8, gezeigt. Zahlreiche Arbeiten (Barrett et al., 1979; Botha et al., 1981; Botha et al., 1978; Thompson et al., 1972) zeigen, dass über die CD-Spektren die Konfiguration an C-4 abgeleitet werden kann. Da es sich hier um langkettige PAs handelt ist durchaus denkbar, dass an C-4 sowohl α - als auch β -konfigurierte Monomere vorkommen. Hier wurde der Versuch unternommen, die vorherrschende Variante in den beiden PAs zu ermitteln. Die α -Konfiguration wird durch negative Cotton-Effekte in einem Wellenlängenbereich von 220-240 nm angezeigt, die β -Konfiguration durch positive Cotton-Effekte im gleichen Messbereich. Da in beiden CD-Spektren zwischen 220-240 nm Werte im Positiven detektiert werden (vgl. Kapitel 3.2), ist davon auszugehen, dass die β -Konfiguration dominiert. Diese Erkenntnis ist auch in Einklang mit den ^{13}C -NMR und polarimetrischen Untersuchungen, da beide die 2,3-*cis* konfigurierten monomeren Einheiten als vorherrschend zeigten. Betrachtet man die isolierten oligomeren PCs (vgl. Kapitel 3.2) sieht man, dass bei den 2,3-*cis* konfigurierten Einheiten die β -Konfiguration an C-4 bevorzugt wird.

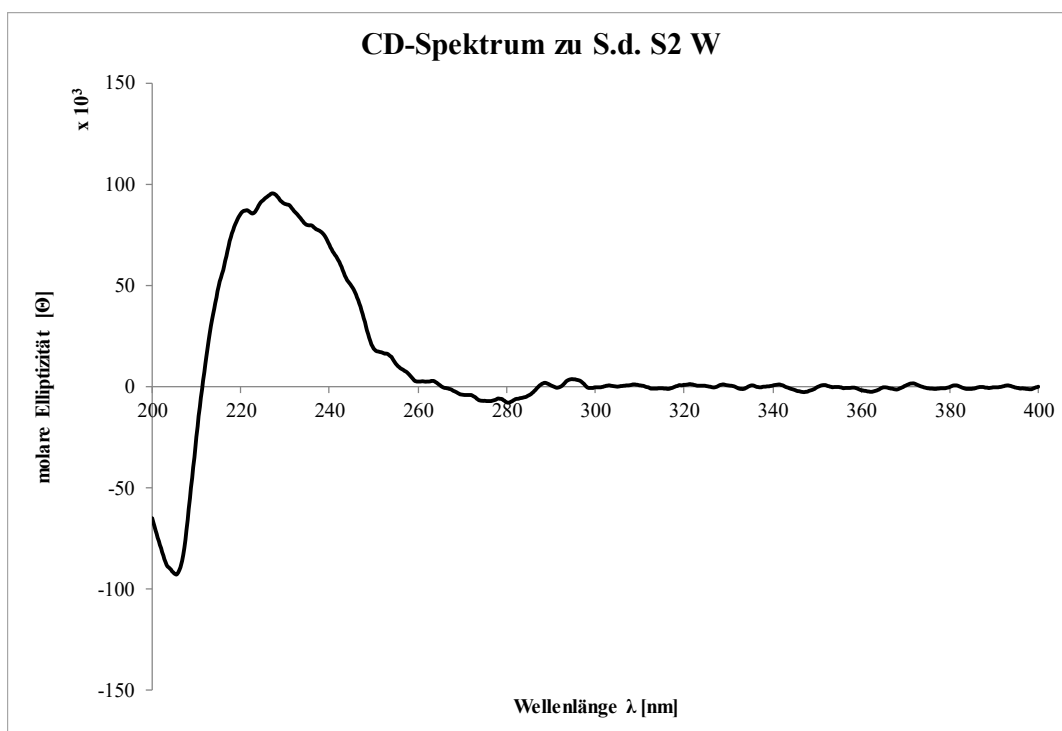


Abb. 4-9: CD-Spektrum der Fraktion S.d. S2 W, welche die „ungewöhnlichen“ PAs enthält. CD (MeOH, Θ) 205,5 (-92820,8), 221,5 (+86787,5), 227 (+95101,3), 280,5 (-8054,69).

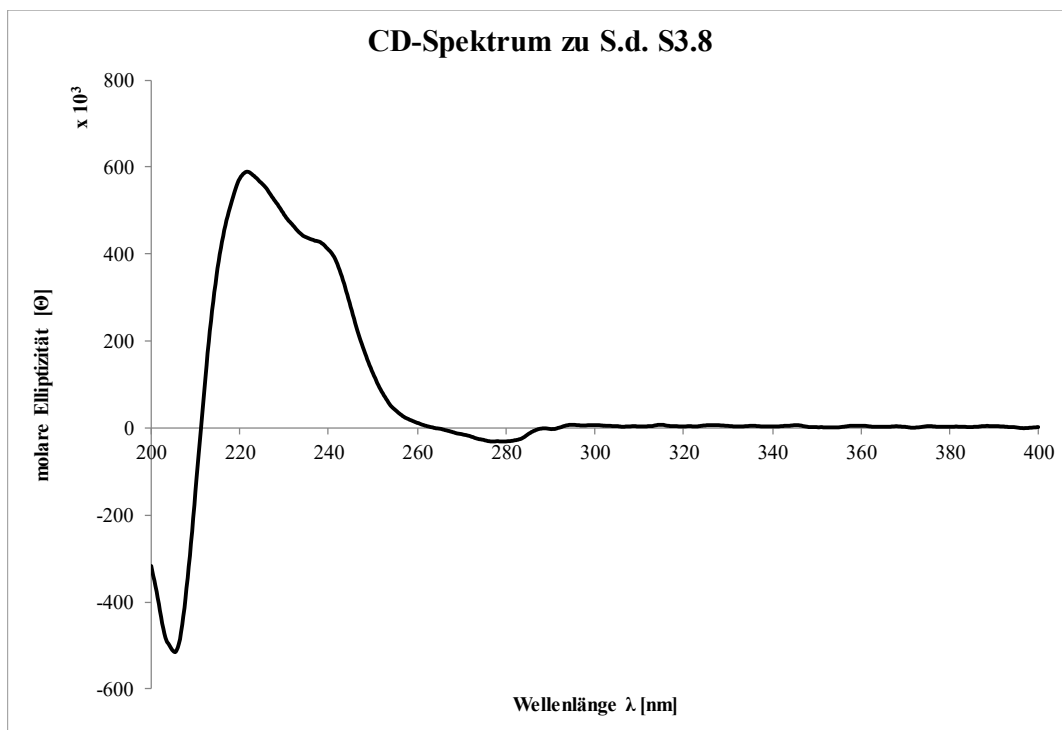


Abb. 4-10: CD-Spektrum zur Fraktion S.d. S3.8, welche die „regulären“ PAs enthält. CD (MeOH, Θ) 205,5 (-515604), 221,5 (+590460), 238 (+429040), 279,5 (-30794).

4.3 Diskussion

Nach sorgfältiger Literaturrecherche (SciFinder®, PubMed.gov, Google Scholar) ist dies das erste Mal, dass polymere PAs in *S. daphnoides* charakterisiert wurden. Ebenso ist es der erste Bericht über PAs, die bei der Trennung an Sephadex® LH-20 bereits zusammen mit den Flavonoiden eluieren und bei der DC, wie die „regulären“ polymeren PAs (Fraktion S.d. S3.8), keine Mobilität mit den hier verwendeten Fließmitteln zeigen. Jedoch konnte kein Substituent bei den „ungewöhnlichen“ PAs gefunden werden, der dieses Verhalten erklären kann. Die erste Vermutung war, dass es sich dabei um ein chromatographisches Problem handelt. Durch die hohe Beladungsmenge der Sephadex® LH-20 Säule ist es durchaus denkbar, dass bereits geringe Stoffmengen der „regulären“ polymeren PAs früher mobilisiert werden. Interessanterweise wurde ein mDP von ca. fünf bei diesen PAs durch den thiolystischen Abbau bestimmt. Pentamere PAs sollten aber eine Mobilität bei den hier verwendeten DC-Systemen zeigen. Das legt die Vermutung nahe, dass hier im Vergleich zu den „regulären“ PAs strukturelle Unterschiede vorliegen sollten. Entweder handelt es sich dabei um Strukturvariationen, die analytisch noch nicht erfasst werden können, oder es wurde noch nicht das geeignete methodische Set gefunden, um diese Fragestellung erfolgreich zu beantworten.

Unabhängig davon liefert die Detektion der Anthocyanidine Pelargonidin und Delphinidin nach der HCl/O₂-Spaltung und der Thioether von Flavan-3-olen mit einfach und dreifach hydroxylierten B-Ringen über HPLC-ESI-HRMS ein nennenswertes Resultat. Damit ist es nicht korrekt diese Verbindungen als PCs zu bezeichnen, da diese Bezeichnung suggerieren würde, dass nur Monomere als Obere Einheiten verbaut sind, die im Zuge einer HCl/O₂-Spaltung zu Cyanidin oxidiert werden können. Das würde nur auf Catechin und Epicatechin, bzw. deren Enantiomere, zutreffen. Diese Ergebnisse zeigen aber deutlich Propelargonidinanteile in beiden verglichenen PAs und Prodelphinidinanteile v.a. bei den „regulären“ PAs. Damit ist die Bezeichnung PAs für beide Substanzcluster die Zutreffende, da diese keinen einheitlichen Typ in Bezug auf den Hydroxylierungsgrad vorgibt. Das Auftreten von Prodelphinidinanteilen ist für *Salix* Spezies nicht ungewöhnlich, zumal Foo et al. (1978) bereits derart substituierte PAs in *Salix caprea* L. finden konnten. Außerdem ist der mDP von zwölf bei den „regulären“ polymeren PAs ein interessanter Wert, zumal in *Salix purpurea* L. lediglich ein mDP von ca. vier bis fünf über ¹³C-NMR-Spektroskopie ermittelt werden konnte (Jürgenliemk et al., 2007).

4.4 Zusammenfassung

In diesem Projekt sollten mögliche strukturelle Unterschiede zwischen zwei mit PAs angereicherten Fraktionen herausgearbeitet werden, wobei die PAs aus der Fraktion S.d. S2 W ein ungewöhnliches chromatographisches Verhalten an den Tag legten. Diese eluierten bei dem Trennschritt an Sephadex® LH-20 bereits mit den Flavonoiden. Allerdings zeigten die Fraktionen bei den hier verwendeten DC-Systemen keine Mobilität. Einen solchen R_F -Wert (0) zeigen aufgrund ihrer hohen Polarität sonst nur die polymeren PAs, die aber erst mit Aceton 70% von der Sephadex® LH-20 Säule gewaschen werden konnten. **Tabelle 4-3** fasst alle gewonnenen Ergebnisse zu den beiden untersuchten PA-reichen Fraktionen zusammen.

Tabelle 4-3: Zusammenfassung der Ergebnisse aus der vergleichenden Charakterisierung der „ungewöhnlichen“ und „regulären“ PAs.

Methode		„ungewöhnliche“ PAs (S.d. S2 W)	„reguläre“ PAs (S.d. S3.8)
Gesamtgerbstoffgehalt		66,5%	84,0%
HCl/O ₂ - Spaltung	Procyanidingehalt	57,9%	78,2%
	Delphinidin	0,8%	4,3%
	Cyanidin	97,8%	94,3%
	Pelargonidin	1,4%	1,4%
¹³ C-NMR	2,3- <i>cis</i> versus 2,3- <i>trans</i>	2,3- <i>cis</i>	2,3- <i>cis</i>
	dreifach hydroxylierte B-Ringe	Nein	Ja
	mDP	nicht bestimmbar	12
mDP nach Thiolyse		4,9	11,8
χ_{cis} (Polarimetrie)		nicht bestimmbar	89,9%
vorherrschende Konfiguration an C-4 (CD)		β	β

4.5 Experimenteller Teil

4.5.1 Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland): MeOH p.a., MeOH für die Flüssigchromatographie, MeOH für die Spektroskopie, MeCN für die Flüssigchromatographie, FA p.a., HOAc p.a., rauchende HCl, Folin-Ciocalteu-Reagenz, getrocknetes Pyridin, Phloroglucinol zur Synthese, Acetanhydrid zur Synthese.

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland): EtOH absolute, Aceton p.a., 1-Butanol p.a., Benzylmercaptan 99%, MeOH- d_4 , Aceton- d_6 , TFA p.a., Pelargonidinchlorid, Delphinidinchlorid $\geq 95\%$ (Fluka, Neu-Ulm, Deutschland), Cyanidinchlorid $\geq 90\%$ (Fluka), Vanillin (Fluka), *p*-Anisaldehyd, D-(-)-Salicin.

Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland): Tanninsäure Ph. Eur. für die Biochemie, wasserfreies Na₂CO₃, Cyanidinchlorid $> 90\%$.

Forschungsinstitut für Leder und Kunststoffbahnen GmbH (Freiberg, Deutschland): Freiberg Hautpulver.

Das H₂O für die Analysen wurde durch eine Astacus Filteranlage der Firma MembraPure GmbH (Henningsdorf/Berlin, Deutschland) aufbereitet.

4.5.2 Anreicherung der Proanthocyanidine aus Fraktion S.d. S2 via Centrifugal Partition Chromatography

Unter Zuhilfenahme einer CPC-Methode wurden die PAs in der Fraktion S.d. S2 angereichert. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine Verteilungschromatographie zwischen zwei nicht miteinander mischbaren flüssigen Phasen.

Verwendung fand eine CPC-Anlage mit einem 250 mL Rotor (Armen Instrument) und einer 510 HPLC-Pumpe (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland). Dabei kam das zwei-Phasen-System 1-Butanol/H₂O zum Einsatz. Dazu wurden die beiden Komponenten vorher gegeneinander gesättigt. Die Anlage wurde zunächst mit der stationären H₂O-Phase beladen. Anschließend wurde das System mit der mobilen 1-Butanol-Phase im „Ascending“-Modus mit einem Fluss von 5 mL/min equilibriert. Die Fraktionskontrolle erfolgte mit dem in Kapitel 3.6.4 vorgestellten DC-System II.

Nach 1269 mL wurden im „Ascending“-Modus keine Verbindungen mehr detektiert. Daher folgte nach diesem Elutionsvolumen ein Umschalten auf den „Descending“-Modus mit dem

damit verbundenen Wechsel der mobilen Phase auf das 1-Butanol gesättigte H₂O. In diesem wässrigen Eluat (678 mL) fanden sich die PAs in der neuen Fraktion S.d. S2 W angereichert. Diese Fraktion wurde mit einem Laborota 4003 (Heidolph) eingeeengt und anschließend mit einer P10-85 Anlage (Dieter Piatkowski – Forschungsgeräte) lyophilisiert. Die Ausbeute betrug 75,1 mg.

4.5.3 Gesamtgerbstoffbestimmung nach Ph. Eur. 2.8.14

Diese Gesamtgerbstoffbestimmung diente zur Charakterisierung der beiden mit PAs angereicherten Fraktionen. Dabei wurde die Methode 2.8.14 des Ph. Eur. (2.8.14, 2015) leicht modifiziert, u. a. nach den Ausführungen von Glasl (1983). Eine Abweichung von der Methode des Ph. Eur. ist die Berechnung des Gehalts. Der Gehalt wurde hier auf Tanninsäure bezogen.

Die Proben von ca. 10,0 mg wurden zu 100,0 mL in einem Messkolben gelöst. Diese Lösung stellt bereits die GPL dar. Jeweils 10,0 mL wurden in einen 50 mL Erlenmeyerkolben überführt, in den vorher 100 mg Freiberg Hautpulver eingewogen wurde. Diese Ansätze wurden für 60 min unter Lichtausschluss auf einem KS/B Laborschüttler (Edmund Bühler GmbH) geschüttelt. Jeder dieser Ansätze wurde durch einen Faltenfilter (Grade 1289; Durchmesser: 125 mm; Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) filtriert. Diese Lösungen waren die RPL. Von diesen Lösungen (GPL und RPL) wurden jeweils 2,0 mL in einen 25,0 mL Messkolben pipettiert, in den vorher 10,0 mL H₂O vorgelegt wurden. Abschließend wurden 1,0 mL Folin-Ciocalteu-Reagenz zugegeben und mit einer 10,6%igen Na₂CO₃-Lösung (53,0 g wasserfreies Na₂CO₃ mit H₂O ad 500,0 mL) auf 25,0 mL aufgefüllt. Die Vermessung der Absorption erfolgte nach exakt 15 min bei einer Wellenlänge von 691 nm an einem Novaspec II Einstrahlphotometer (Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden). Für die Berechnung wurde jeweils der Mittelwert der entsprechenden Parameter aus einer dreifachbestimmung der Tanninsäure herangezogen. Die Gleichung für die Berechnung des Gesamtgerbstoffgehalts bezogen auf Tanninsäure als 100% Kontrolle lautet:

$$\text{Gesamtgerbstoffgehalt [\%]} = 100 \times \frac{(A_{\text{GPL}} - A_{\text{RPL}})_{\text{Probe}} \times m_{\text{Tanninsäure}}}{(A_{\text{GPL}} - A_{\text{RPL}})_{\text{Tanninsäure}} \times m_{\text{Probe}}}$$

A_{GPL} = Absorption der Gesamtphenollösung bei 691 nm.

A_{RPL} = Absorption der Restphenollösung bei 691 nm.

$m_{\text{Tanninsäure}}$ = Einwaage der Tanninsäure [mg].

m_{Probe} = Einwaage der Probe [mg].

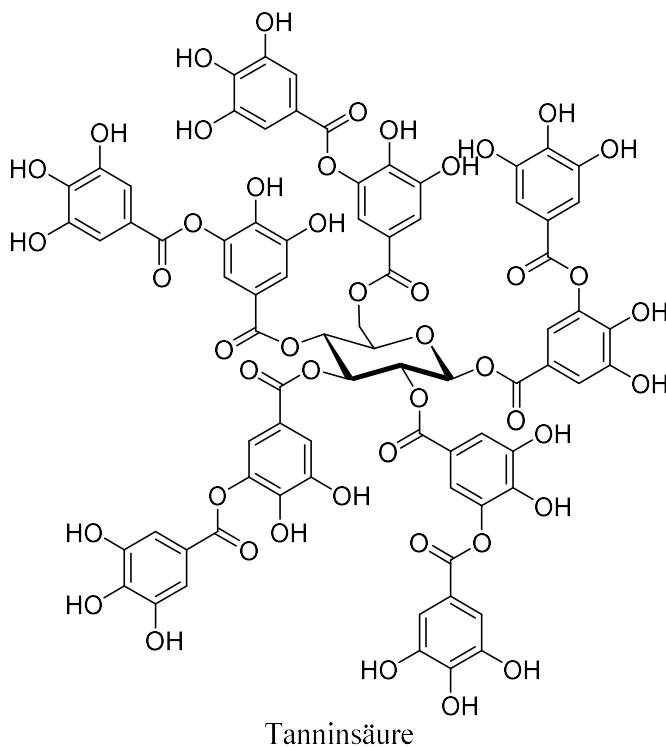


Abb. 4-11: Strukturformel der Tanninsäure mit der Summenformel $\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$ (Carl Roth GmbH & Co. KG), die für die Berechnung der Gesamtphenol- und Gesamtgerbstoffgehalte verwendet wurde.

4.5.4 Proanthocyanidinspaltung in Gegenwart von Phloroglucinol

Durch diese Methode sollten im Gegensatz zur in Kapitel 4.5.5 beschriebenen Methode größere Fragmente durch einen partiellen Abbau in Gegenwart des Nukleophils Phloroglucinol in salzsaurem EtOH generiert werden. In **Abb. 4-11** ist die Reaktionsgleichung abgebildet. Diese Variante stellt eine Modifikation der von Bicker et al. (2009) vorgestellten Methode dar. Weiter bleibt durch diese Spaltung die Stereochemie an C-4 der oberen Einheiten erhalten (Matthews et al., 1997).

Zu je 1 mg Probe wurden 150 μ L einer salzsauren Phloroglucinollösung in EtOH (1,0 mL HCl mit EtOH ad 100,0 mL, 5,6 mg/mL Phloroglucinol) pipettiert. Das bedeutet, dass die Phloroglucinollösung der jeweiligen Ansatzgröße angepasst wurde. Dieser Ansatz wurde für 30 min unter Lichtausschluss bei RT inkubiert. Die erhaltenen Lösungen wurden je nach Ansatzgröße entweder unter einem N_2 -Strom oder mit Hilfe eines Laborota 4003 (Heidolph) Rotationsverdampfer getrocknet.

UHPLC-Anlage I: 1290 Infinity UHPLC (Agilent) mit einem G4220A binären Pumpen-Cluster, einem G4226A Autosampler, einem G1316C Säulenofen, einem G4212A DAD und Q-TOF 6540 UHD Massenspektrometer mit einem Dual-ESI als Ionenquelle.

Die Reaktionsprodukte wurden mit der UHPLC-Anlage I unter Verwendung einer YMC-Triart C18, 1.9 μ m, 75 \times 2 mm Trennsäule (YMC Europe GmbH, Dinslaken, Deutschland) bewerkstelligt. Der Säulenofen wurde bei 25 $^{\circ}$ C betrieben und der Detektionsbereich des Massenspektrometers erstreckte sich von m/z 80 - 1400. Als Eluenten dienten H_2O (A) und MeCN (B), die beide einen Zusatz von 0,1% FA enthielten. Dieses UHPLC-System I wurde mit dem in **Tabelle 4-4** gezeigten Gradienten mit einem Fluss von 0,6 mL/min betrieben.

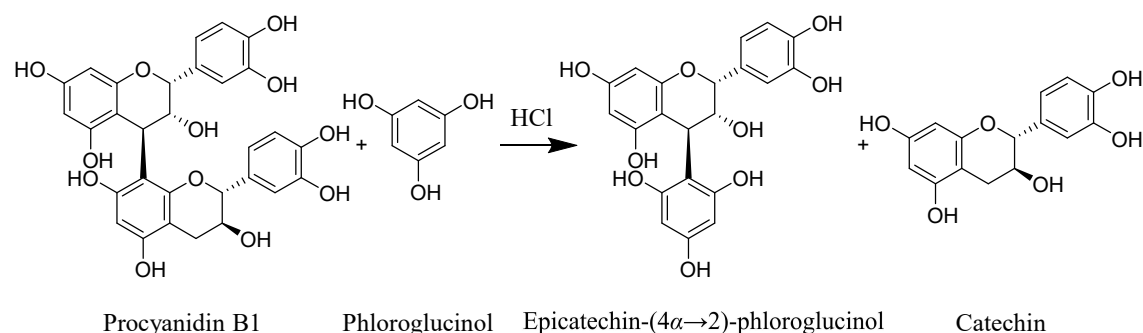


Abb. 4-12: Reaktionsgleichung zum Phloroglucinolabbau am Beispiel von PC B1.

Tabelle 4-4: Gradient zum UHPLC-System I zur Identifizierung der Reaktionsprodukte des Phloroglucinolabbaus.

t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	100	0
12,0	60	40
14,0	2	98
14,1	100	0
16,0	100	0

4.5.5 Bestimmung des mDP über einen thiolytischen Abbau

Dieses Verfahren war nötig, um den mDP der PAs in den beiden Fraktionen zu ermitteln, da die PAs in der Fraktion S.d. S2 W nicht für eine MS-Untersuchung ionisiert werden konnten. Ausgangspunkt für diese Methode lieferten die Arbeiten von Dauer et al. (2003) und Matthews et al. (1997). Es handelte sich bei dieser Reaktion um eine Spaltung in essigsauerm EtOH, bei der das Nukleophil Benzylmercaptan zugesetzt wurde. Dieses ist in der Lage, über seine Thiolgruppe kovalent an Position C-4 der verlängernden Einheiten zu binden. Die Reaktionsgleichung dieser Thiolyse ist in **Abb. 4-12** veranschaulicht.

Etwa 3,0 mg Probe wurden in ein Mikrowellenvial eingewogen und in 300 μ L EtOH unter Zusatz von 15 μ L Benzylmercaptan und 15 μ L HOAc gelöst. Dieses Reaktionsgefäß wurde anschließend mit einem Gummiseptum verbördelt und für fünf Tage in einem Trockenschrank (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) inkubiert, um einen möglichst vollständigen Abbau zu erreichen. Nach Ablauf dieses Zeitintervalls wurden die Lösungen unter einem N_2 -Strom zur Trockene gebracht. Nach einem erneuten Lösen der Rückstände in 1,00 mL EtOH und Filtration durch einen Perfect-Flow[®] RC Spritzenvorsatzfilter (WICOM) war die Probenvorbereitung abgeschlossen.

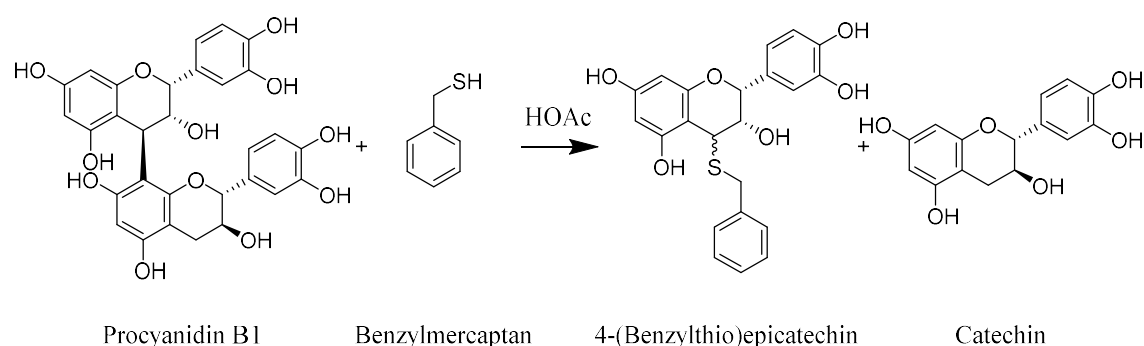


Abb. 4-13: Reaktionsgleichung zur Thiolyse am Bsp. PC B1.

HPLC-Anlage III: LaChrom Elite mit L-2130 Säulenofen, L-2130 Pumpen-Cluster, L-2200 Autosampler und L-2455 DAD (Merck Chemicals GmbH).

Zur Analytik der Reaktionsprodukte wurde HPLC-Anlage III verwendet. Als Trennsäule fungierte eine Hibar[®] 250-4, Purospher[®] STAR RP-18e (5 µm) HPLC-Säule (Merck Chemicals GmbH). Der Säulenofen wurde mit einer Temperatur von 25 °C betrieben und detektiert wurde bei 280 nm. Das Injektionsvolumen betrug 5 µL. Die Trennung erfolgte mit dem in **Tabelle 4-5** gezeigten binären Gradienten (Eluent A: H₂O mit 0,02% TFA; Eluent B: MeOH/MeCN/H₂O (5+4+1 [V/V/V])) mit einem Fluss von 1 mL/min.

Zur Berechnung des mDP wurden alle Flächen der Reaktionsprodukte (Untere Einheiten und Obere Einheiten) summiert. Dieser Wert wurde anschließend zu den Flächen der endständigen, bzw. untersten, Einheiten nach dieser Gleichung ins Verhältnis gesetzt:

$$mDP = \frac{\sum AUC_{\text{verlängernde Einheiten}} + \sum AUC_{\text{endständige Einheiten}}}{\sum AUC_{\text{endständige Einheiten}}};$$

Tabelle 4-5: Gradient zur Trennung der Thiolyseprodukte über das HPLC-System V

t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	95	5
10	95	5
20	70	30
48	30	70
52	30	70
54	0	100
65	0	100
67	95	5
73	95	5

Die Identifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte über eine HPLC-ESI-HRMS-Untersuchung über die UHPLC-Anlage I (vgl. Kapitel 4.5.4) mit dem HPLC-System VI. Die Parameter wurden identisch zum HPLC-System V gewählt. Dabei wurden die Massenfragmente von m/z 80 – 1400 erfasst. Beim Eluenten A wurde aus Rücksicht auf das Massenspektrometer der saure Modifier TFA durch einen Zusatz von 0,1% FA ersetzt. **Tabelle 4-6** zeigt eine Auflistung der Peaks mit der jeweiligen zugehörigen R_t , dem jeweiligen m/z -Wert aus der HRMS, der errechneten Summenformel und dem kalkulierten m/z -Wert für diesen Summenformelvorschlag.

Tabelle 4-6: Retentionszeiten und m/z der HRMS zu den detektierten Thiolyseprodukten. Mit „*“ gekennzeichnete Peaks wurden nur nach dem Abbau der PAs in der Fraktion S.d. S3.8 gefunden und mit „**“ gekennzeichnete nur bei den PAs der Fraktion S.d. S2 W.

Peak	R_t [min]		m/z [M-H] ⁻	Summenformel (kalkuliertes [M-H] ⁻)
	HPLC- System VI	HPLC- System V		
1	20.97	22.82	289.0725	C ₁₅ H ₁₄ O ₆ (289.0718)
2	23.25	25.14	289.0723	C ₁₅ H ₁₄ O ₆ (289.0718)
3**	35.06	36.92	699.1544	C ₃₇ H ₃₂ O ₁₂ S (699.1542)
4*	36.60	38.40	427.0862	C ₂₂ H ₂₀ O ₇ S (427.0857)
5	37.24	39.08	699.1548	C ₃₇ H ₃₂ O ₁₂ S (699.1542)
6	39.08	40.81	699.1545	C ₃₇ H ₃₂ O ₁₂ S (699.1542)
7**	39.33	41.71	699.1540	C ₃₇ H ₃₂ O ₁₂ S (699.1542)
8*	40.50	42.19	699.1543	C ₃₇ H ₃₂ O ₁₂ S (699.1542)
9	41.39	43.12	411.0908	C ₂₂ H ₂₀ O ₆ S (411.0908)
10	44.45	46.12	395.0963	C ₂₂ H ₂₀ O ₅ S (395.0959)

4.5.6 Quantifizierung des Gesamt-Procyanidin-Gehalts nach der Monographie Weißdornfrüchte des Ph. Eur. und Ermittlung der verlängernden Einheiten als deren Anthocyanidine (HCl/O₂-Spaltung)

Diese Methode orientiert sich an der PC-Gehaltsbestimmung, die in der Monographie Weißdornfrüchte der Ph. Eur. 7.6. (Weißdornfrüchte, 2011) beschrieben ist. Diese Methode dient zum einen als Konventionmethode, um den Gehalt an PAs in den angereicherten Fraktionen zu bestimmen, und zum anderen als Ausgangspunkt zur Untersuchung der monomeren Zusammensetzung dieser PAs. Das Reaktionsprinzip beruht auf einer oxidativen Spaltung der 4→6 und 4→8 Verknüpfungen zwischen den einzelnen Monomeren im salzsauren unter Einfluss von Luftsauerstoff. Das zugehörige Reaktionsprinzip ist in **Abb. 4-13** gezeigt. Dabei werden die oberen Einheiten abgespalten und zu ihrem korrespondierenden Anthocyanidin oxidiert (z.B.: Afzelechin → Pelargonidin; Catechin → Cyanidin; Gallocatechin → Delphinidin).

Proben von 10,0 mg wurden in einem Gemisch aus EtOH 70%, 6,0 mL einer HCl-Verdünnung (70,0 g rauchende HCl + H₂O ad 100,0 mL) und 4,0 mL H₂O gelöst. Dieser Ansatz wurde für 80 min im Wasserbad zum Rückfluss erhitzt. Nach einem Filtrationsschritt durch einen Faltenfilter (Grade 1289; Durchmesser: 240 mm; Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) wurde das Filtrat mit EtOH 70% gewaschen und in einem Messkolben auf 100,0 mL aufgefüllt. Aus jedem Ansatz wurden 50,0 mL in einen Rundkolben überführt und in einem Laborota 4003 (Heidolph Instruments GmbH & Co.) auf ca. 3 mL eingeeengt. Dieses Konzentrat wurde anschließend mit zwei Waschschritten mit 10 und 5 mL H₂O in einen Scheidetrichter überführt. Die durch die Reaktion gewonnen Anthocyanidine wurden dreimal mit 1-Butanol extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und mit 1-Butanol auf 100,0 mL aufgefüllt. Die Absorption bei 545 nm dieser Lösung wurde in einem Einstrahlphotometer Novaspec II (Pharmacia LKB) ermittelt. Zum Abzug des Hintergrundsignals diente eine nach dem gleichen Verfahren hergestellte Blindprobe.

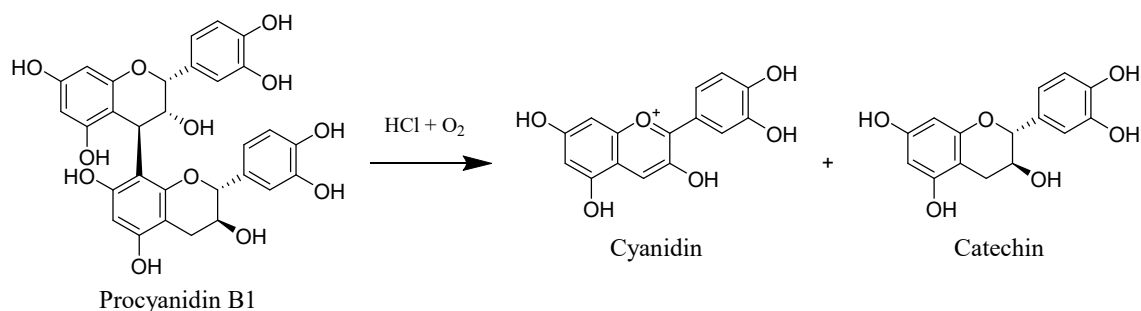


Abb. 4-14: Reaktionsgleichung zur HCl/O₂-Spaltung am Bsp. PC B1.

Der Gehalt an PCs wurde als Cyanidinchlorid mit folgender Formel berechnet:

$$PC [\%] = \frac{A \times 200}{75 \times m};$$

A	=	gemessene Absorption bei 545 nm
m	=	Einwaage der Probe [g]
75	=	$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (Cyanidinchlorid)
200	=	Verdünnungsfaktor

Um detailliertere Informationen bzgl. der monomeren Einheiten zu erhalten, wurde ergänzend mit diesen finalen Lösungen eine HPLC-Analytik durchgeführt. Dabei kam die in Kapitel 4.5.5 beschriebene HPLC-Anlage III mit einer LiChroCART® 250-4, Purospher® STAR RP-18e (5 µm) HPLC-Säule (Merck Chemicals GmbH) mit dem hier beschriebenen HPLC-System VII zum Einsatz. Dieses HPLC-System orientiert sich an einer von Zhang et al. (2004) vorgestellten HPLC-Methode. Der Säulenofen wurde bei einer Temperatur von 35 °C betrieben. Zur Proben-vorbereitung wurden 25,0 mL der Lösungen für die UV-metrische Vermessung zur Trockene mit einem Laborota 4003 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG) eingedampft. Der Rückstand wurde in 1,00 mL MeOH gelöst und durch einen Perfect-Flow® RC Spritzenvorsatzfilter (WICOM Germany GmbH) filtriert. Zur Generierung der Chromatogramme bei 525 nm wurden 10 µL auf die Anlage injiziert. Die Trennung erfolgte mit einem Fluss von 0,8 mL/min mit den Eluenten MeCN (A) und H₂O (B), die beide 0,02% TFA enthielten, mit dem in **Tabelle 4-7** gezeigten Gradienten.

Die R_f s der Anthocyanidine Pelargonidin, Cyanidin und Delphinidin wurden über Referenzsubstanzen ermittelt. In **Tabelle 4-8** ist die jeweilige R_f dem entsprechenden Anthocyanidin zugeordnet.

Tabelle 4-7: Gradient zur Trennung der aus der HCl/O₂-Spaltung entstandenen Anthocyanidine.

t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	82	18
30	82	18
31	0	100
36	0	100
38	82	18
28	82	18

Tabelle 4-8: R_t der jeweiligen Anthocyanidine im HPLC-System VII.

	Pelargonidin	Cyanidin	Delphinidin
R_t [min]	5,91	10,07	18,28

Zusätzlich wurde der qualitative Nachweis der drei aufgeführten Anthocyanidine über eine HPLC-ESI-HRMS Untersuchung an UHPLC-Anlage I (vgl. Kapitel 4.5.4) mit einer Zorbax Eclipse Plus C18, 1.8 μm , 50×2.1 mm HPLC-Säule (Agilent) UHPLC-Säule über das UHPLC-System II durchgeführt. Der Wellenlängenbereich im DAD lag zwischen 190-640 nm und der Säulenofen wurde bei 40 °C betrieben. Es wurden die Fragmente von m/z 80 - 1400 detektiert. Den Eluenten A (H_2O) und B (MeCN) wurden jeweils 0,1% FA zugesetzt. Mit einem Fluss von 0,6 mL/min wurde der in **Tabelle 4-9** aufgeführte Gradient abgefahren.

Tabelle 4-9: Gradient zum UHPLC-System II zur qualitativen Identifizierung der Anthocyanidine nach der HCl/ O_2 -Spaltung.

t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,0	95	5
4,0	2	98
5,0	2	98
5,1	95	5
6,0	95	5

4.5.7 NMR-spektroskopische Verfahren

Um die PAs als Gruppe in den jeweiligen Fraktionen zu charakterisieren, wurden 1D- ^{13}C -NMR-Spektren mit 8192 Scans an dem bereits in Kapitel 3.6.8 beschriebenen NMR-Spektrometer AVANCE III 600 NMR mit 5 mm TCI CryoProbe (Bruker Corporation) (^{13}C -NMR: 150,95 MHz) bei RT aufgenommen. Die hohe Anzahl an Scans war nötig, um bei diesen oligomeren, bzw. polymeren, Verbindungen auswertbare Signale zu erhalten. Für dieses Verfahren wurden jeweils 20,0 mg Probe in 0,6 mL eines $\text{MeOH-}d_4/\text{D}_2\text{O}$ -Gemischs (7+3, [V/V]) gelöst.

4.5.8 Circular dichroismus

Um den Datensatz für die PA-reichen Fraktionen zu vervollständigen, wurden auch hier jeweils die CD-Spektren vermessen. Dabei wurden alle Parameter wie in Kapitel 3.6.10 gewählt. Allerdings kam für dieses Experiment ein Lösungsmittelgemisch aus MeOH für die Spektroskopie und H₂O (80+20 [V/V]) zum Einsatz. S.d. S2 W wurde in einer Konzentration von 0,06 mg/mL und S.d. S3.8 zu 0,12 mg/mL gelöst.

4.5.9 Polarimetrische Untersuchungen

Die Ermittlung des spezifischen Drehwerts bei 578 nm $[\alpha]_{578}^{20}$ wurde zur Berechnung des 2,3-*cis*/2,3-*trans*-Verhältnisses, wie von Czochanska et al. (1980) und Porter (1989) beschrieben, genutzt.

Hierzu kam ein 341 Polarimeter (Perkin Elmer, Inc., Waltham, MA, USA) mit einem Mikromessrohr (Länge: 100 mm; Volumen: 1.0 mL) zum Einsatz. Die beiden PA-reichen Fraktionen S.d. S2 W und S.d. S3.8) wurden in MeOH für die Spektroskopie gelöst. Der Anteil 2,3-*cis* konfiguierter monomerer Einheiten χ_{cis} wurde mit folgender Gleichung abgeschätzt:

$$\chi_{cis} [\%] = \frac{[\alpha]_{578}^{20} + 320}{480} \times 100$$

5 Anpassung der Methode 2.8.14 des Ph. Eur. für einen größeren Probendurchsatz

5.1 Hintergrund

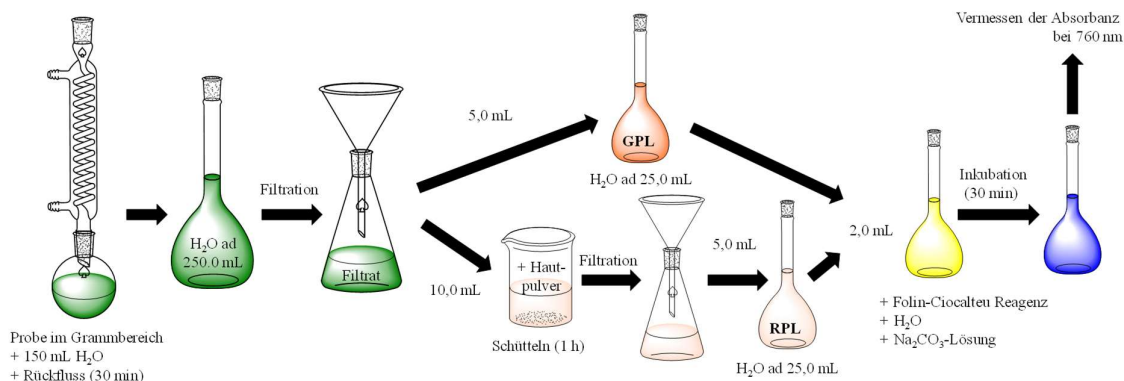
Für Projekte mit einem hohen Probendurchsatz sollte die Methode 2.8.14 des Ph. Eur. (2.8.14, 2015) optimiert werden, um eine große Anzahl an Ansätzen innerhalb eines Tages zu vermessen. Dazu sollte die Methode auf einen Mikrotiter-Maßstab herunterskaliert, die Detektionswellenlänge (Glasl H., 1983), die Mischungen der Reaktanden (Li et al., 2007) und die finale Inkubationszeit vor der Messung angepasst werden. Außerdem wurde das Ziel formuliert, die zugrundeliegende Redoxreaktion bzgl. ihrer Stöchiometrie zu evaluieren.

5.2 Entwicklung und Validierung der Methode

In **Abb. 5-1** ist die modifizierte Methode der originalen Methode aus dem Ph. Eur. (2.8.14, 2015) gegenübergestellt. Die Reduzierung der Arbeitsschritte wird hier deutlich ersichtlich. Im Folgenden wird die Validierung der Methode erläutert und eine stöchiometrische Korrelation zu funktionellen Gruppen hergestellt. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Konventionsmethode, die sämtliche oxidierbaren Verbindungen erfasst. Die entsprechende Reduzierung des Folin-Ciocalteu Reagenz ist in **Abb. 4-3** gezeigt. Diesbezüglich wurde die Reaktionskinetik für verschiedene phenolische Verbindungen untersucht, um den optimalen Zeitpunkt für die photometrische Vermessung zu ermitteln.

Zunächst wurde untersucht nach welchem Zeitpunkt die Reaktion vollständig abgeschlossen ist. Dazu wurde die Reaktionskinetik für jede untersuchte Verbindung im Triplikat vermessen. **Abb. 5-2** zeigt dazu graphisch die Veränderung der Absorption jeweils einer exemplarischen Konzentration verschiedener phenolischer Verbindungen über den beobachteten Zeitraum von 180 min. Dabei konnte gezeigt werden, dass zwischen 150 und 180 min keine Änderung der

Ph. Eur. 2.8.14:



Modifizierte Methode:

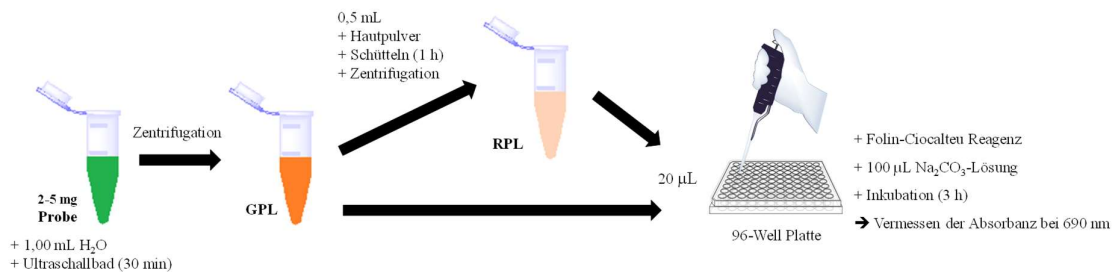


Abb. 5-1: Arbeitsschritte der Ph. Eur. Methode 2.8.14 im Vergleich zur modifizierten Methode.

Absorption mehr zu verzeichnen ist. Aus diesem Grund wurde die Zeit für den letzten Inkubationsschritt in diesem Messprotokoll auf 180 min festgelegt, um der Reaktion noch einen Sicherheitszuschlag von 30 min zu gewähren.

Für jede Kalibriergerade wurden drei Stammlösungen mit unabhängigen Einwaagen hergestellt. Aus diesen Stammlösungen wurden jeweils zwei Verdünnungsreihen mit sechs verschiedenen Konzentrationen hergestellt. Damit wurden die Kalibriergeraden in Duplikaten aus Triplikaten ermittelt. Die Konzentrationsbereiche zusammen mit den Bereichen der Absorption und alle im Rahmen dieser Validierung erhobenen Parameter sind in **Tabelle 5-1** aufgeführt. **Abb. 5-3** zeigt zudem exemplarisch die Kalibriergerade des Catechols. Weiter muss dazu erwähnt werden, dass die final im Assay befindlichen Konzentrationen hierfür herangezogen wurden. Das bedeutet, dass eine 1 + 9 [V/V] Verdünnung durch die zugesetzten Reaktanden (Folin-Ciocalteu Reagenz, Na₂CO₃-Lösung) berücksichtigt wurde. Es fiel zunächst ein mäßiges Ansprechen der Salicylsäure in diesem Assay auf, da hier die Steigung der Kalibriergeraden mit deutlichem Abstand den kleinsten Wert zeigt. Da dieser Assay durch die Zugabe von Na₂CO₃-Lösung im basischen Milieu stattfindet, ist die Säurefunktion der Salicylsäure bereits deprotoniert. Damit ist eine Stabilisierung dieses Anions über Tautomerie mit dem Proton der phenolischen OH-Gruppe und über ein mesomeres System möglich. Durch eine Oxidation der phenolischen OH-Gruppe sind diese Mechanismen zur Stabilisierung des Moleküls nicht mehr denkbar. Außerdem ist durch diese saure Verbindung eine Senkung des pH-Wertes wahrscheinlich, so dass das Milieu für diese Reaktion nicht mehr optimal ist. Die Bestimmtheitsmaße zeigen alle Werte $\geq 0,9850$ (Catechin). Daher ist die Linearität für die vermessenen Konzentrationsbereiche bewiesen. Da die Verdünnungsreihen jeder Kalibriergeraden insgesamt sechsmal hergestellt und die Kalibriergeraden durch die Gesamtheit aller Messpunkte gelegt wurden, fungiert das Bestimmtheitsmaß auch als Streuparameter. Deshalb kann auch die Robustheit und Wiederholbarkeit dieser Methode angenommen werden. Um die Nachweisgrenze und die Quantifizierungsgrenze dieser Methode bzgl. phenolischer Verbindungen besser zu charakterisieren, wurden auch LOD und LOQ für jede dieser Modellsubstanzen errechnet. Die Wiederholbarkeit dieses Versuchsaufbaus bzgl. pflanzlicher Proben wurde weiter durch das Vermessen eines Hexaplikats von *Quercus cortex plv.* überprüft. Dazu wurde der Gesamtphenol- und

Tabelle 5-1: Parameter aller im Rahmen der Validierung erhobenen Daten. Die Kalibriergeraden wurden in Duplikaten von Triplikaten ermittelt. Die extrapolierte 1 M Absorption dient zur Korrelation möglicher stöchiometrischer Zusammenhänge. Der y-Wert der Kalibriergeraden steht für die AUC [AU], der x-Wert für die Konzentration [μM].

	Konzentrationsbereich [μM]	Kalibriergerade GPL	LOD [μM]	LOQ [μM]	Bereich der Absorption [AU]	Bestimmtheitsmaß R^2	Extrapolierte 1 M Absorption
Catechol	15-157	$y = 0,0111x + 0,0584$	7	23	0,2012-1,7920	0,9979	11100
Catechin	7-74	$y = 0,0148 + 0,1164$	9	30	0,1690-1,2143	0,9850	14800
PC B1	4-40	$y = 0,0271x + 0,0954$	4	15	0,1533-1,1724	0,9867	27100
Gallussäure	15-158	$y = 0,0091x + 0,0432$	12	39	0,1679-1,4617	0,9939	9100
Ferulasäure	15-154	$y = 0,0064x + 0,0932$	12	41	0,1709-1,1127	0,9930	6400
Tanninsäure	1,4-15	$y = 0,0876x + 0,0389$	1	3	0,1536-1,4111	0,9965	87600
Salicylsäure	15-153	$y = 0,0013x + 0,0595$	15	50	0,0688-0,2503	0,9899	1300

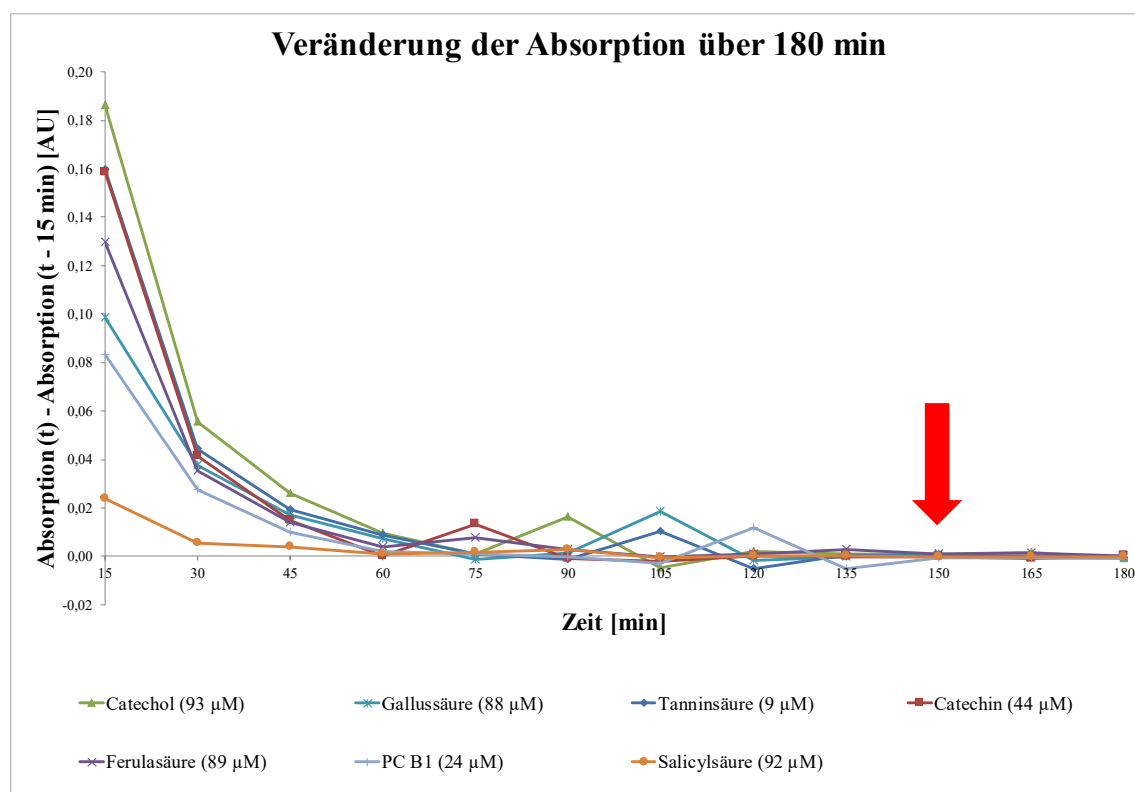


Abb. 5-2: Für jedes der untersuchten Phenole wurde hier die Differenz der Absorption eines Messpunktes (Absorption (t)) und des vorhergegangenen Messpunktes (Absorption (t - 15 min)) gegen die Reaktionszeit aufgetragen. Für diese Abbildung wurde für jede Verbindung eine mittlere Konzentration aus den Verdünnungsreihen zur Kalibrierung exemplarisch herausgegriffen. Der rote Pfeil bei 150 min markiert den Zeitpunkt, ab dem die Reaktion abgeschlossen war, da ab hier keine Änderung in der Absorption detektiert wurde.

Gesamtgerbstoffgehalt jeweils als Tanninsäure (vgl. **Abb. 4-11** in Kapitel **4.5.3**) berechnet. Im Detail sind diese Ergebnisse in **Tabelle 5-2** aufgeführt. Um zu überprüfen, ob alle zwölf Messungen zusammengefasst werden dürfen, wurde in den jeweiligen Testgruppen (Gesamtphenole, Gesamtgerbstoffe) auf Normalverteilung geprüft. Die in **Tabelle 5-3** aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass nach dem Kolomogorov-Smirnov-Test für beide Gruppen die Normalverteilung als Nullhypothese beibehalten werden kann. Für die Gesamtphenole wird dieses Resultat durch den Shapiro-Wilk-Test weiter untermauert, wobei dieser für die Gesamtgerbstoffe das Ablehnen dieser Nullhypothese indiziert. Fasst man die Ergebnisse aller zwölf Messungen zusammen, ergibt sich für den Gesamtphenolgehalt $5,1\% \pm 0,5\%$ und für die Gesamtgerbstoffe $4,3\% \pm 0,5\%$. Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass diese Methode auch bei pflanzlichen Proben wiederholbare und robuste Ergebnisse liefert.

Da es sich bei dieser Methode um eine Konventionsmethode handelt, die dazu geeignet ist, gesamte Stoffgruppen unter definierten Bedingungen zu erfassen, ist es nicht möglich, Rückschlüsse auf den wahren Wert zu ziehen. Diese Methode ist auch nicht sehr spezifisch auf Phenole, da im Laufe dieser Validierung auch ein ansprechen von Ascorbinsäure gezeigt werden konnte. Das ist nicht weiter verwunderlich, da auch letztere oxidiert werden kann, was eine Redox-Reaktion mit dem Folin-Ciocalteu Reagenz ermöglicht.

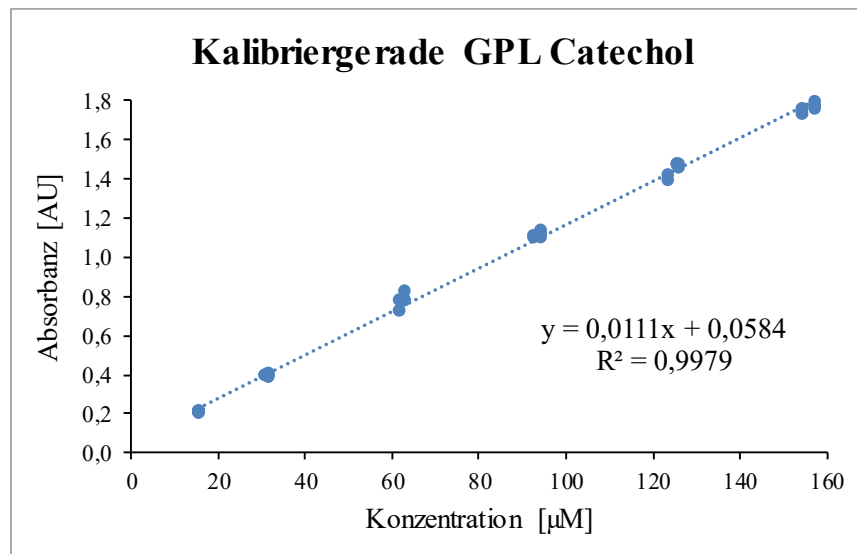


Abb. 5-3: Exemplarisch ist hier die Kalibriergerade der GPL des Catechols gezeigt. Für jede Konzentration wurden sechs Messwerte erhoben. Dazu wurden aus drei Stammlösungen jeweils zwei Verdünnungsreihen hergestellt.

Tabelle 5-2: Werte der Gesamtphenole und Gesamtgerbstoffe aller Einzelmessungen von *Quercus cortex plv.*. Bei den Messungen 1 – 6 wurden Einwaagen von 2,7 - 3,4 mg extrahiert und stellten direkt die GPL dar, bei den Messungen 7 – 12 wurden 25,8 - 28,6 mg extrahiert. Letztere Lösungen wurden vor der Vermessung 1 + 9 [V/V] mit H₂O verdünnt. Der Mittelwert \pm SD gibt Auskunft über die Streuung der Ergebnisse. Alle Werte sind in % [m/m] angegeben und als Tanninsäure berechnet.

	Messungen						Mittelwert \pm SD
	1	2	3	4	5	6	
Phenole [%]	5,5	5,8	5,2	5,6	5,5	5,4	5,5 \pm 0,2
Gerbstoffe [%]	4,7	4,8	4,4	4,7	4,7	4,6	4,7 \pm 0,2

	Messungen						Mittelwert \pm SD
	7	8	9	10	11	12	
Phenole [%]	5,1	4,4	4,8	4,4	4,6	4,3	4,6 \pm 0,3
Gerbstoffe [%]	4,4	3,7	4,0	3,8	3,8	3,7	3,9 \pm 0,3

Tabelle 5-3: Ergebnisse der statistischen Tests auf Normalverteilung. Eine Signifikanz $> 0,05$ bedeutet, dass die Normalverteilung als Nullhypothese beibehalten werden kann. Die Markierung „*“ zeigt eine untere Grenze der echten Signifikanz an.

	Signifikanz	
	Kolmogorov-Smirnov (Signifikanz- korrektur nach Lilliefors)	Shapiro-Wilk
Gesamtphenole (n: 1-6)	0,200*	0,933
Gesamtgerbstoffe (n: 1-6)	0,077	0,178
Gesamtphenole (n: 7-12)	0,200*	0,389
Gesamtgerbstoffe (n: 7-12)	0,069	0,051
Gesamtphenole (n: 1-12)	0,200*	0,234
Gesamtgerbstoffe (n: 1-12)	0,200*	0,030

Tabelle 5-4: Anzahl phenolischer OH-Gruppen und phenolischer Ringsysteme für jede vermessene Verbindung. Diese Werte werden gegen die extrapolierte 1 M Absorption korreliert.

	Catechol	Catechin	PC BI	Gallussäure	Ferulasäure	Tanninsäure	Salicylsäure
Phenolische OH-Gruppen	2	4	8	3	1	30	1
Phenolische Ringsysteme	1	2	4	1	1	10	1

Abschließend soll noch auf mögliche stöchiometrische Zusammenhänge zwischen den Reaktanden und dem Folin-Ciocalteu Reagenz eingegangen werden. Dazu wurde für jede untersuchte Verbindung die in **Tabelle 5-1** aufgeführte extrapolierte 1 M Absorption gegen die Anzahl phenolischer OH-Gruppen, bzw. phenolischer Ringsysteme, jedes Moleküls aufgetragen. Diese Stoffparameter sind in **Tabelle 5-4** aufgeführt. Für beide Korrelationen konnte ein linearer Zusammenhang hergestellt werden. Dazu sind in **Abb. 5-4** die zugehörigen Diagramme gezeigt. Dabei zeigt die Korrelation mit den phenolischen OH-Gruppen die bessere Übereinstimmung (Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9936$) im Vergleich zur Korrelation mit den phenolischen Ringsystemen ($R^2 = 0,9829$). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Response dieses Assays in einem linearen Zusammenhang mit der Anzahl phenolischer OH-Gruppen in der jeweiligen Analyse steht. Jedoch müssen noch weitere phenolische Modellsubstanzen mit dieser Methode vermessen werden, um diese Aussage zu untermauern.

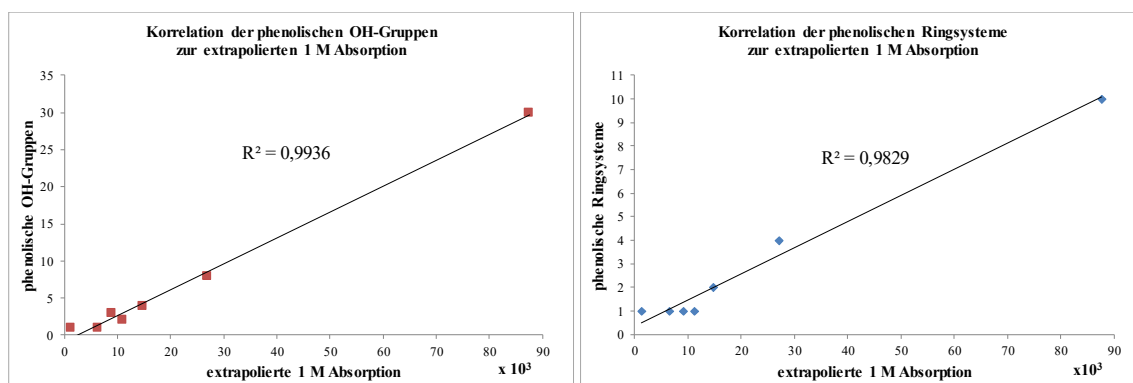


Abb. 5-4: Korrelation der phenolischen OH-Gruppen (links) und der phenolischen Ringsysteme (rechts) zur extrapolierten 1 M Absorption.

5.3 Diskussion

Der Ursprung für die hier vorgestellte Variante dieser Methode wurde bereits im Jahr 1927 durch Folin und Ciocalteu (1927) gelegt. Diese erarbeiteten einen Assay zur Quantifizierung von Tyrosin und Tryptophan. Entscheidender Vorteil der jetzt vorgestellten Modifikation ist die Skalierung auf einen Mikrotitermaßstab. So ist es möglich, höhere Probenzahlen komfortabel an einem Tag zu vermessen. Weiter lieferte die Aufnahme von Daten bzgl. der Reaktionskinetik diverser phenolischer Verbindungen wertvolle Erkenntnisse. So wurde festgestellt, dass nach einer Reaktionszeit von 180 min ein robustes Auslesen der 96-Well-Platten möglich ist, da ab diesem Zeitpunkt in jedem Fall die zugrundeliegende Redoxreaktion abgeschlossen ist. Weiter konnte auch keine Instabilität des vermessenen Produkts detektiert werden, da zu keinem Zeitpunkt ab 150 min eine verminderte Absorption festzustellen ist. Die hier neu definierte Inkubationszeit von 180 min lässt außerdem genügend Zeitraum für die Vorbereitung weiterer Messungen, sodass durch einen gestaffelten Probenplan die Effektivität bzgl. des Zeitmanagements weiter gesteigert werden kann. In der Literatur sind die verschiedensten Zeitintervalle vor der photometrischen Vermessung zu lesen. So schlägt Glasl (1983) 15 min, das Ph. Eur. 30 min (2.8.14, 2015), Li und Mitarbeiter (2007) sowie Nadpal und Mitarbeiter (2016) 120 min Wartezeit vor der photometrischen Vermessung vor. Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigen jedoch, dass gerade Inkubationszeiten von < 60 min ein äußerst präzises Timing voraussetzen, um robuste Ergebnisse zu erhalten. Nach bestem Wissen ist hier das erste Mal ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen funktionellen Gruppen (phenolische OH-Gruppen, phenolische Ringsysteme) und der Response der zu Grunde liegenden Reaktion gezeigt worden. Dabei konnte vor allem ein sehr guter linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl phenolischer OH-Gruppen und der extrapolierten 1 M Absorption der untersuchten Verbindungen gezeigt werden.

5.4 Zusammenfassung

In diesem Projekt wurde die Methode 2.8.14 des Ph. Eur. (2.8.14, 2015) erfolgreich modifiziert. Das Ziel, eine Methode zu erarbeiten, die schneller und einfacher durchgeführt werden kann, wurde erfolgreich umgesetzt. Somit ist es einer einzelnen Person ohne weiteres möglich, mindestens 120 Proben an einem Tag zu vermessen. Das ist ein Probendurchsatz, der mit der Originalmethode unmöglich realisiert werden kann. Außerdem wurde diese modifizierte Methode bzgl. ihrer Wiederholbarkeit, Robustheit, Reproduzierbarkeit und Linearität validiert. Schwächen dieser Methode liegen in ihrer mangelnden Spezifität, zumal auch andere Verbindungen, wie Ascorbinsäure, Reaktionspartner mit dem Folin-Ciocalteu Reagenz sein können. Damit ist es auch unmöglich, einen „wahren Wert“ in pflanzlichen Proben zu ermitteln.

5.5 Experimenteller Teil

5.5.1 Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkircher, Deutschland): 1,2-Dihydroxybenzen (Catechol) $\geq 99\%$, Salicylsäure p.a. $\geq 98\%$, Gallussäure (Fluka) $\geq 98\%$, (+)-Catechin hydrat $\geq 98\%$.

Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland): Folin-Ciocalteu's Reagenz, L-(+)-Ascorbinsäure.

Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland): Tanninsäure Ph. Eur. für die Biochemie, Ferulasäure $\geq 98\%$, Na_2CO_3 anhydricus.

Caesar & Loretz GmbH (Hilden, Deutschland): Quercus cortex plv.

Forschungsinstitut für Leder und Kunststoffbahnen GmbH (Freiberg, Deutschland): Freiberg Hautpulver.

PC B1 wurde aus *Salix daphnoides* VILL. isoliert (vgl. Kapitel 3.2.2) Für die Korrektur der Einwaagen wurden die Ergebnisse der Elementaranalyse ($\text{PC B1} \cdot 4 \times \text{H}_2\text{O}$) berücksichtigt.

Das H_2O für die Analysen wurde durch eine Astacus Filteranlage der Firma MembraPure GmbH (Henningsdorf/Berlin, Deutschland) aufbereitet.

5.5.2 Probenvorbereitung

Die Referenzsubstanzen wurden in definierten Volumina H_2O gelöst, um die Stammlösungen für die Verdünnungsreihen zu erhalten. Diese Lösungen entsprachen den GPL. Je Referenz wurden drei Stamm-GPL hergestellt. Aus jeder dieser Lösungen wurden zwei Verdünnungsreihen für die Kalibriergeraden hergestellt. Damit erfolgte die Überprüfung des Quantifizierungsbereichs und der Linearität in Duplikaten von Triplikaten.

Für Quercus cortex plv. wurden zwölf Wiederholungen zur Überprüfung der Robustheit, der Wiederholbarkeit und der Präzision durchgeführt. Dazu wurden Proben von 2,7 - 3,4 mg (Proben 1 - 6) und sechs weitere zwischen 25,0 - 28,0 mg (Proben 7 - 12) in 1,00 mL H_2O im Ultraschallbad 30 min extrahiert. Diese Ansätze wurden anschließend zentrifugiert (14000 rpm, 3 min). Die Überstände der Proben 7 - 12 wurden mit H_2O 1 + 9 [V/V] verdünnt, um die GPL zu erhalten, wohingegen die Überstände der Proben 1 - 6 direkt die GPL darstellten.

5.5.3 *Modifizierte Methode zur Gesamtphenol- und Gesamtgerbstoffbestimmung in Anlehnung an die Methode 2.8.14 des Ph. Eur.*

Zur Herstellung der RPL wurden 0,5 mL GPL in ein 1,5 mL SuperSpin™ microtube (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland), in welches vorher 5-10 mg Freiberg Hautpulver eingewogen wurde, pipettiert. Diese Ansätze wurden unter Lichtausschluss für 60 min auf einem KS/B Laborschüttler (Edmund Bühler GmbH) geschüttelt. Die Überstände nach Zentrifugation (14000 rpm, 3 min) waren die entsprechenden RPL.

Zur Vermessung der Lösungen (GPL und RPL) wurden jeweils 20 µL in die 60 inneren Wells einer 96-Well Polystyren F-bottom microplate (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) pipettiert. Um Randeffekte auszuschließen, wurden die Wells des äußeren Randes mit jeweils 200 µL H₂O beschickt. Zu jeder Lösung wurden 100 µL einer Mischung aus Folin-Ciocalteu's Reagenz und H₂O (1 + 9, [V/V]) hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde für vier Minuten unter Lichtausschluss geschüttelt. Abschließend wurden zu jeder Probe 80 µL einer 10,6%-igen Na₂CO₃ anhydricus in H₂O gegeben. Die Absorption dieser Ansätze wurde bei 690 nm in einem SpectraFLUOR PLUS® Lesegerät (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) zur Aufnahme der Reaktionskinetik in 15 min Intervallen über 180 min vermessen. Die Proben zur einmaligen Vermessung wurden für 180 min unter Lichtausschluss geschüttelt und anschließend mit den gleichen Parametern vermessen.

Zur Berechnung des Gesamtphenolgehalts wurde die ermittelte Absorption der entsprechenden GPL als eine Referenz berechnet. Der Gesamtphenolgehalt der RPL wurde identisch durchgeführt. Durch Subtraktion der berechneten RPL-Konzentration von der GPL-Konzentration konnte der Gesamtgerbstoffgehalt ermittelt werden. Die Konzentrationen der Gesamtphenole und -gerbstoffe der Droge Quercus cortex plv. wurde im Rahmen der Methodenvalidierung als Tanninsäure berechnet.

5.5.4 Ermittlung der Kalibriergeraden und Überprüfen der Linearität und Streuung

Die Steigung m der jeweiligen Kalibriergerade wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$m = \frac{\sum(x - \bar{x}) \times (y - \bar{y})}{\sum(x - \bar{x})^2}$$

y = y-Wert des jeweiligen Punkts in der Kalibriergerade

\bar{y} = Mittelwert aller y-Werte in der Kalibriergeraden

x = x-Wert des jeweiligen Punkts in der Kalibriergeraden

\bar{x} = Mittelwert aller x-Werte in der Kalibriergeraden

Der y-Achsenabschnitt b der entsprechenden Kalibriergeraden wurde mit dieser Formel berechnet:

$$b = \bar{y} - m \times \bar{x}$$

\bar{y} = Mittelwert aller y-Werte in der Kalibriergeraden

\bar{x} = Mittelwert aller x-Werte in der Kalibriergeraden

m = Steigung der Kalibriergeraden

Die Eignung der ermittelten Kalibriergerade und die Streuung der einzelnen Messpunkte wurde über das Bestimmtheitsmaß R^2 mit folgender Formel überprüft:

$$R^2 = \left[\frac{\sum(x - \bar{x}) \times (y - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x - \bar{x})^2 \times \sum(y - \bar{y})^2}} \right]^2$$

y = y-Wert des jeweiligen Punkts in der Kalibriergerade

\bar{y} = Mittelwert aller y-Werte in der Kalibriergeraden

x = x-Wert des jeweiligen Punkts in der Kalibriergeraden

\bar{x} = Mittelwert aller x-Werte in der Kalibriergeraden

5.5.5 Ermittlung LOD und LOQ

LOD und LOQ wurden nach der ICH Guideline Q2(R1) (ICH Expert Working Group, 2005) über die Kalibriergeraden nach folgenden Formeln ermittelt:

$$LOD = 3 \times \frac{\sigma}{m} \qquad LOQ = 10 \times \frac{\sigma}{m}$$

σ = Reststandardabweichung der Messpunkte zur Kalibriergeraden

m = Steigung der Kalibriergeraden

Die Reststandardabweichung σ wurde über folgende Formel ermittelt:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2 - \frac{[\sum (x - \bar{x}) \times (y - \bar{y})]^2}{\sum (x - \bar{x})^2}}{n - 2}}$$

y = y-Wert des jeweiligen Punkts in der Kalibriergerade

\bar{y} = Mittelwert aller y-Werte in der Kalibriergeraden

x = x-Wert des jeweiligen Punkts in der Kalibriergeraden

\bar{x} = Mittelwert aller x-Werte in der Kalibriergeraden

5.5.6 Statistische Tests

Um festzustellen, ob die Hexaplikate (n: 1 - 6 & n: 7 - 12), bzw. alle zwölf Messungen (n: 1 - 12) bzgl. der Gesamtphenole und -gerbstoffe in *Quercus cortex plv.* der gleichen Verteilung angehören, oder ob Ausreißer eliminiert werden müssen, wurden die entsprechenden statistischen Tests mit der Software SPSS 24.0.0.1 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland) durchgeführt.

Mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test mit einer Signifikanzkorrektur nach Lilliefors sowie mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde geprüft, ob die Nullhypothese einer Normalverteilung verworfen werden muss. Dabei zeigt eine Signifikanz $> 0,05$ an, dass die Nullhypothese beibehalten werden kann. Mit dem in selbiger Software bereitgestelltem Ausreißertest wurde überprüft, ob Einzelmessungen nicht berücksichtigt werden dürfen. Mit diesem Test wurde in keiner der beiden Testgruppen ein Ausreißer identifiziert, sodass alle Werte berücksichtigt werden konnten.

6 Analytische Pilotstudie zum Vergleich des phenolischen Inhaltsstoffspektrums mehrerer Weidenarten innerhalb einer Wachstumsperiode

6.1 Hintergrund

In dieser Studie sollten die Jahresverläufe der Konzentrationen phenolischer Inhaltsstoffe von 13 Weiden während einer Wuchsperiode (Frühjahr / Sommer) untersucht werden. Dabei wurden die Blätter und die diesjährigen Triebe der folgenden Individuen beprobt: *Salix pentandra* L. ♂, *S. alba* L. ♂, *S. fragilis* L. ♀, *S. caprea* L. ♂ & ♀, *S. cinerea* L. ♂, *S. caprea* x *cinerea* ♂, *S. daphnoides* VILL. ♂ & ♀, *S. purpurea* L. ♀, *S. dasyclados* WIMM. ♂, *S. elaeagnos* SCOP. ♀, *S. repens* L. ♀. Dieses Projekt ist eine Zusammenarbeit mit dem Ökologisch-Botanischen Garten der Universität Bayreuth und dessen Leiter PD Dr. Gregor Aas. Die Gattung *Salix* L. umfasst mehr als 500 Arten (Lauron-Moreau et al., 2015; Wu et al., 2015). Aus diesem Grund ist die Kooperation mit dem Ökologisch-Botanischen Garten der Universität Bayreuth sehr wertvoll, da hier im Rahmen eines Salicetums etwa 90 verschiedene Taxa dieser Gattung kultiviert und systematisch zweifelsfrei bestimmt sind (Aas und Holdenrieder, 2009).

Die Beprobung der Blätter und diesjährigen Triebe begründete sich auf Ergebnisse von Julkunen-Tiitoo et al. (1988), die bereits in *S. caprea* Unterschiede im phenolischen Inhaltsstoffspektrum der Rinde, Blatt- und Blütenknospen untersuchten. Daher sollten auch hier die Gehalte der jeweiligen Verbindungen, bzw. Stoffgruppen, in erwähnten Geweben bestimmt und auch die Gewichtung zwischen den beprobten Pflanzenorganen betrachtet werden. Weiter sollten auch die Geschlechter zweier Weiden (*S. caprea* und *S. daphnoides*) verglichen werden, um die unterschiedliche Akkumulation phenolischer Verbindungen in den Geschlechtern einer Art zu bewerten. Dazu gibt es bisher nur wenige analytische Arbeiten (Julkunen-Tiitto et al., 1988; Nybakken und Julkunen-Tiitto, 2013). Deutliche Unterschiede außerhalb der Phenole zeigten Arbeiten bzgl. der Blütenduftstoffe (Füssel et al., 2007) und der Zuckerzusammensetzung des Nektars (Dötterl et al., 2014). Diese Resultate lassen eine chemotaxonomische Differenzierung zwischen den Geschlechtern einer Weidenart möglich erscheinen. Außerdem konnten auch ökologische Aspekte und ein unterschiedlicher Gebrauch sekundärer Metabolite männlicher und weiblicher Pflanzen besonders unter Stressbedingungen beobachtet werden (Orlofsky et al., 2016). So war es beispielsweise Bajpai und Mitarbeitern (2016) möglich, in der Spezies *Tinospora cordifolia* (Menispermaceae) anhand der Alkaloide in den Stämmen zwischen Männchen und Weibchen zu differenzieren. Durch diese Ergebnisse

motiviert, sollten die Phenole in diesem Probenstet auch im Hinblick auf diese Fragestellung untersucht werden. Der letzte Gesichtspunkt, der betrachtet werden sollte, war die Zusammensetzung der Phenole in dem Hybrid *S. caprea* x *cinerea* im Verhältnis zu seinen Eltern. Dabei handelt es sich um einen Aspekt der bereits öfter beschrieben wurde. So analysierten Orians und Mitarbeiter (Orians et al., 2000; Orians und Fritz, 1995) die phenolischen Glykoside und die PAs in *S. sericea*, *S. eriocephala* und ihrer Hybride. Eine weitere Studie bzgl. *S. caprea*, *S. repens* und derer F1 und F2 Hybride war weiter in der Lage Korrelationen zwischen diesen Arten und Folgen der Hybridisierung über die phenolischen Glykoside und der PAs herzustellen (Hallgren et al., 2003). Eine weitere Arbeit von Oberprieler et al. (2013) beschäftigte sich mit der Untersuchung von *S. alba*, *S. fragilis* und deren Hybrid *S. x rubens*. Dabei schlugen sich auch hier Einflüsse der Hybridisierung im phenolischen Inhaltsstoffspektrum nieder, jedoch wurden die phenolischen Verbindungen nicht genauer identifiziert. Außerdem konnte auch an Arbeiten im Genus *Populus* (ebenfalls Salicaceae) durch die Hybridisierung begründete Unterschiede innerhalb der phenolischen Glykoside (Rehill et al., 2005) oder der PAs (Scioneaux et al., 2011) abgeleitet werden. Diese Arbeiten konnten zeigen, dass Hybridisierung zu einer chemischen Diversifikation führt, die in einem evolutionstechnischen oder ökologischen Vorteil münden könnte, wie Orians (2000) in einem Übersichtsartikel zusammenfasst.

Diverse methodische Ansätze wurden in der vorliegenden Arbeit genutzt, um das phenolische Metabolom in 13 Weidenindividuen zu analysieren. Dabei handelte es sich um einen sehr kleinen Auszug bisher bekannter Arten. Da es sich beim Genus *Salix* um eine Gattung mit sehr großer Anzahl an Vertretern mit großer morphologischer Bandbreite handelt (Skvortsov und Zinovjev, 1999; Trybush et al., 2008; Wu et al., 2015), die auch die Fähigkeit zur Hybridisierung besitzen (Holdenrieder et al., 1999), können Unterschiede im phenolischen Sekundärmetabolismus durchaus erwartet werden. Dabei erfuhren die PAs besondere Beachtung. Diese wurden für *Salix* erstmals unter Berücksichtigung der Kettenlängen mittels einer UPLC®-Methode analysiert. Bisher waren in der Literatur lediglich grobe Analysemethoden für das Erfassen dieser Substanzklasse beschrieben. So nutzte Thieme (1968) einen gravimetrischen Hauptpulverassay zur Quantifizierung der Gerbstoffe in *Salicis cortex*, Julkunen-Tiitto und Mitarbeiter (Julkunen-Tiitto, 1986, 1985b; Julkunen-Tiitto und Meier, 1992; Nyman und Julkunen-Tiitto, 2005) machten sich eine Kombination des Folin-Ciocalteu-Assays, einer oxidativen Spaltung in Butanol/HCl und eines Vanillin/HCl-Assays zu Nutze, um die Gerbstoffe bzw. die PAs zu erfassen. Ein weiterer analytischer Ansatz mittels HPLC (Esatbeyoglu et al., 2010) oder HPTLC (Poblocka-Olech und Krauze-Baranowska, 2008) nutzte zwar durchaus modernere

chromatographische Methoden, jedoch beschränkten sich dabei die Untersuchungen lediglich auf dimere PCs und/oder monomere Flavan-3-ole. Isolierungsstudien mit der Rinde von *S. purpurea* (Jürgenliemk et al., 2007), *S. sieboldiana* (Hsu et al., 1985) oder *S. daphnoides* (vgl. Kapitel 3) zeigten allerdings, dass das Spektrum innerhalb der Flavan-3-ole zwischen verschiedenen Spezies durchaus recht divers sein kann. So war es Foo und Porter (1978) sogar möglich ein dimeres PD, mit einer oberen Gallocatechin- und unteren Catechineinheit, in *S. caprea* nachzuweisen. Das Biflavanoid [2',2']-(+)-Catechin-(+)-taxifolin wurde von Kolodziej (1988) aus einer nicht genauer spezifizierten Weidenrinde isoliert. Dabei handelte es sich zwar um kein PA, jedoch demonstriert diese Verbindung auf eine weitere Weise, wie divers die biosynthetische Verarbeitung der Flavan-3-ole sein kann. Diese Ergebnisse könnten auf die große ökologische Bedeutung der Flavan-3-ole und insbesondere der PAs zurückzuführen sein (vgl. Kapitel 2), so dass Pflanzen Vorteile von einer möglichst großen Vielfalt innerhalb dieser Strukturklasse profitieren könnten. Dass eine analytische Betrachtung des PA-Metaboloms aufgeschlüsselt nach ihren DP's sinnvoll erscheint, zeigten Untersuchungen an Weißdorn (Hellenbrand et al., 2015b) und Johanniskraut (Hellenbrand et al., 2015a). Schließlich erfordert die Komplexität der PA-Muster die Entwicklung und Anwendung neuer analytischer Herangehensweisen, um die PA-Zusammensetzung in nahezu allen *Salix* species bzgl. bisher unbeantworteter Fragestellungen in ihrer Systematik zu bearbeiten.

Zur Erfassung der PA-Muster in diversen Weiden, wurde von Hellenbrand et al. (2015b) eine UPLC[®]-Methode genutzt, welche die Erfassung der oligomeren (DP 2 – DP 10) und der polymeren PAs, getrennt nach ihren DP's, ermöglichte (vgl. **Abb. 6-1**). Die monomeren Flavan-3-ole (Catechin, Epicatechin) wurden aus dem Fingerprint der Chromatogramme einer RP-18-UPLC[®]-Methode qualitativ erfasst und quantifiziert. Ebenso wurde das gesamte Flavan-3-ol Metabolom über selbige Methode erfasst. Aus diesen Daten konnte der Gesamt-PA-Gehalt, die Muster nach DP, das Verhältnis oligomerer PAs zu den Gesamt-PAs und die Gehalte an Catechin und Epicatechin extrahiert werden. Des Weiteren wurde unter Zuhilfenahme einer UHPLC-ESI-HRMS-Methode qualitativ nach der Verbindung Catechin-3-*O*-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure)-ester gesucht. Letztere Verbindung könnte ein möglicher chemotaxonomischer Marker sein und wurde bislang aus der Rinde einer *S. purpurea* (Jürgenliemk et al., 2007) und *Salix sieboldiana* BLUME (Hsu et al., 1985) isoliert.

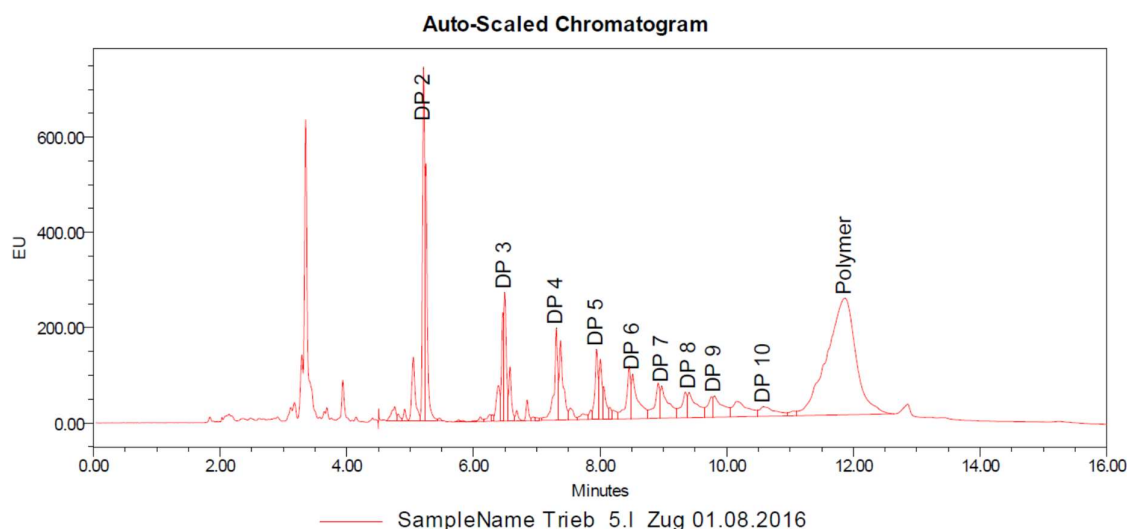


Abb. 6-1: Beispielhaftes Chromatogramm zur PA-Analytik der in dieser Arbeit untersuchten diesjährigen Triebe einer *S. alba* mit dem Probenzugsdatum 01.08.2016. Die oligomeren Cluster sind je nach DP mit „DP 2“ bis „DP 10“ gekennzeichnet. Die polymere Fraktion trägt die Beschriftung „Polymer“. Anwendung fand die in Kapitel 6.5.5 (Hellenbrand et al., 2015b) beschriebene Methode. Die Detektion erfolgte über einen FLR-Detektor ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 316 \text{ nm}$).

Die Salicylalkoholderivate stellen zweifelsohne die am besten untersuchte Inhaltsstoffgruppe innerhalb der Salicaceae dar. Besonders durch Arbeiten von Thieme (Thieme, 1969, 1965d, 1965a, 1965b, 1965c, 1964a, 1964b, 1964c, 1963) wurde bereits während der 1960er Jahre ein sehr breiter Grundstock bzgl. dieser Substanzklasse gelegt. Schwerpunkte dieser Studien waren zum einem die Isolierung der Salicylalkoholderivate, die meist auch unter dem Begriff Phenolglykoside in der Literatur Erwähnung finden und zum andern deren analytische Detektion und Quantifizierung. Für die analytische Erfassung bediente sich Thieme einer Auftrennung via Papierchromatographie, Derivatisierung mit Millons-Reagenz, anschließendem Ausschneiden der entsprechenden Zonen und photometrischer Vermessung (Thieme, 1965b). So nutzte Thieme diese Verfahrensweise auch, um Jahresverläufe der Konzentrationen von Salicin und Salicortin in den Blättern von *S. pentandra* ♀ und *S. purpurea* ♂ als auch von Salicortin, Salicin, Triandrin, Picein, Salireposid und Grandidentatin in den Rinden von *S. alba* ♂, *S. cinerea* ♂ und *S. purpurea* ♂ zu erfassen. Diese Arbeit stellt einen interessanten Bezugspunkt für die vorliegende Arbeit dar, zumal alle genannten Spezies auch in diesem Probenaset enthalten sind. Andere Autoren setzten in dieser Zeit auf DC-Methoden (Audette et al., 1966; Binns et al., 1968). Durch die Nutzung der Gas-Flüssig-Chromatographie nach Überführung der Salicylalkohole in ihre Trimethylsilylderivate wurde durch Bolan und Steele (1968) ein neuer Standard zur Quantifizierung dieser Verbindungen gelegt. Diese prinzipielle Verfahrensweise war eine wichtige Grundlage zur Analytik dieser Substanzen (Julkunen-Tiitto, 1989b, 1986,

1985a, 1985b; Steele et al., 1972; Steele et al., 1969; Tahvanainen et al., 1985). Durch Meier und Mitarbeiter (1988) wurde erstmals eine neue HPLC-Methode der bisher etablierten gas-chromatographischen Untersuchungsmethode gegenübergestellt. Dabei konnten äquivalente Resultate erzielt werden. Das HPLC-Verfahren mit UV-Detektion hat den Vorteil, dass die Proben vorher nicht derivatisiert werden müssen. Damit trat diese Instrumentierung einen Siegeszug in der Analytik der Salicylalkohole an (z.B.: Egloff, 1982; Förster et al., 2010; Förster et al., 2008; Hallgren et al., 2003; Heiska et al., 2005; Julkunen-Tiitto und Gebhardt, 1992; Julkunen-Tiitto und Meier, 1992; Julkunen-Tiitto und Sorsa, 2001; Lindroth und Pajutee, 1987; Meier et al., 1986, 1985a; Meier et al., 1985b; Nyman und Julkunen-Tiitto, 2005, 2000; Orians et al., 2000; Orians, 1995; Orians und Fritz, 1995; Paajanen et al., 2011; Pobłocka-Olech et al., 2007; Sticher et al., 1981; Sulima et al., 2017; Torp et al., 2013). Dabei sind im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit vor allem die Studien von Meier et al. (1985a) und Förster und Mitarbeitern (2008) von Interesse, da beide auch den Jahresverlauf der Gehalte an Salicylalkoholen betrachteten. Beide Arbeiten schlossen die Rinden von *S. purpurea* und *S. daphnoides* und letztere zusätzlich von *S. pentandra* Individuen ein.

In diesem Projekt sollten mehrere Substanzklassen aus einem HPLC-Fingerprint erfasst werden. Dabei handelte es sich um sehr komplexe Chromatogramme, die für eine übersichtliche Darstellung der Ergebnisse vereinfacht werden mussten. Dazu wurden die Peaks ihren jeweiligen Substanzgruppen nach deren charakteristischen UV-Maxima zugeordnet (vgl. Kapitel 6.5.6), als ihre jeweilige Modellsubstanz quantifiziert und schließlich die Gesamtkonzentrationen erfasst. Das Aufsummieren scheint legitim, betrachtet man gerade die von Thieme (Thieme, 1965c) publizierten Verläufe, bei denen die einzelnen Phenolglykoside zwar unterschiedliche Gehalte auswiesen, jedoch kongruente Jahresverläufe zeigten. Weiter entschlossen sich auch Förster et al. (2008), die Konzentrationen kumuliert zu betrachten.

Die Phenylpropansäuren stellen eine Stoffgruppe in der Gattung *Salix* dar, die bislang nicht intensiv in Weiden untersucht wurde. Gerade in Bezug auf jahreszeitliche Konzentrationsverläufe konnte für diese nach sorgfältiger Literaturrecherche (PubMed.gov, SciFinder®, Google Scholar) keine Studie mit dieser Ausrichtung gefunden werden. Nichtsdestotrotz stellt diese Klasse eine relevante Stoffgruppe in Salicaceen dar und wurde bei einigen Projekten ebenfalls miterfasst (Nyman und Julkunen-Tiitto, 2005; Paajanen et al., 2011; Pobłocka-Olech et al., 2010; Torp et al., 2013). So stellt diese Arbeit die erste Bewertung jahreszeitlicher Verläufe dieser Substanzgruppe in *Salix* Spezies dar. Dabei wurden die Peaks aus den RP-18-UPLC®-Fingerprint Chromatogrammen über die entsprechenden UV-Maxima den Phenylpropansäuren zugeordnet (vgl. Kapitel 6.5.6).

Eine große Stoffgruppe des Pflanzenreichs stellen die Flavonoide dar und soll im Folgenden ohne die Flavan-3-ole betrachtet werden, da diese ja bereits zusammen mit den PAs gesondert behandelt werden. Innerhalb dieser Gruppe haben besonders die Flavanone, wie Naringenin- oder Eriodyctiolderivate, (Freischmidt et al., 2015; Freischmidt et al., 2012; Hänsel et al., 1960; Kammerer et al., 2005; Meier et al., 1985a; Pearl und Darling, 1970; Póblocka-Olech et al., 2007; Pohjamo et al., 2003; Tegelberg und Julkunen-Tiitto, 2001) und die Chalkone, wie das Isosalipurposid (Freischmidt et al., 2015; Freischmidt et al., 2012; Kammerer et al., 2005; Meier et al., 1985a; Pearl und Darling, 1970) in Untersuchungen besondere Aufmerksamkeit erfahren. Es wurde aber auch die Anwesenheit von Flavonen (Julkunen-Tiitto und Sorsa, 2001; Nyman und Julkunen-Tiitto, 2005; Torp et al., 2013) und Flavonolen (Nybakken und Julkunen-Tiitto, 2013; Nyman und Julkunen-Tiitto, 2005; Pohjamo et al., 2003; Torp et al., 2013) in zahlreichen Studien bestätigt. Von besonderem Stellenwert für dieses Projekt ist auch hier, wie bei den Salicylalkoholderivaten, die Arbeit von Meier und Mitarbeitern (1985a), welche die Konzentrationen des (+/-)-Naringenin-5-*O*-glucosids sowie des Isosalipurposids in *S. purpurea* und *S. daphnoides* und in letzterer Weide zusätzlich die Gehalte des Naringenin-7-*O*-glucosids im Jahresverlauf erfassten.

Aufgrund der verhältnismäßig hohen und schwer zu differenzierenden UV-Maxima der Flavone, Flavonole und Chalkone wurden diese Verbindungen für die Betrachtung der Jahresverläufe als Gruppe „Flavonoide / Chalkone“ zusammengefasst. Diese Sammelgruppe zeigte ausnahmslos in allen untersuchten Spezies in den Blättern die höheren Gehalte. Diese Beobachtung dürfte mit einer schützenden Funktion vor UV-B-Strahlen in Zusammenhang zu bringen sein. So konnte bereits eine Hochregulierung der Flavonoide durch UV-Strahlen gezeigt werden (Turtola et al., 2005). Diese Schutzfunktion sollte besonders in den Blättern erforderlich sein, da diese das Gewebe mit der höchsten Sonnenexposition darstellen dürften. Durch Meier et al. (1985a) wurde zumindest das Isosalipurposid bzgl. jahreszeitlicher Konzentrationsverläufe in den Rinden von *S. purpurea* und *S. daphnoides* erfasst. Außerdem wurde innerhalb dieser Stoffgruppe über eine UHPLC-ESI-HRMS/MS Methode nach der möglichen Markersubstanz 6‘‘-*O*-*trans-p*-Cumaroylisosalipurposid (Freischmidt, 2011) in allen Proben vom 01.08.2016 gesucht.

6.2 Ergebnisse

6.2.1 Vergleichende Bewertung der Gesamtphenole und -gerbstoffe

Um einen Überblick über den Gehalt an Phenolen und Gerbstoffen in den untersuchten Individuen zu bekommen, wurde die in Kapitel 5 vorgestellte Methode durchgeführt. Die Jahresverläufe des Gesamtphenol- und Gesamtgerbstoffgehalts sind in **Abb. 6-2** und **Abb. 6-3** gezeigt.

Auffallend ist, dass bei allen Weiden sowohl in den Blättern, als auch in den diesjährigen Trieben die Gerbstoffe den größten Anteil der Phenolfraction ausmachen. So wurden stets Gerbstoffanteile innerhalb des Phenolspektrums > 50% (Triebe, 05.07.2016, *S. daphnoides* ♂) detektiert. Bei *S. dasyclados* sind die Gerbstoffe scheinbar sogar stellvertretend für das gesamte phenolische Spektrum (Triebe, 01.08.2016). Von diesen hohen Werten weichen die Triebe der *S. pentandra* (05.06.2016, 40%), die Blätter der *S. elaeagnos* (10.05.2016, 38%) und die Blätter der *S. repens* (10.05.2016, 48%) an einzelnen Messzeitpunkten ab. Lediglich *S. purpurea* stellte eine besondere Ausnahme dar. Diese Art war niemals in der Lage, einen Gerbstoffanteil über 50% bezogen auf den Gesamtphenolgehalt auszubilden. Hier wurden Gerbstoffanteile von 28-50% in diesjährigen Trieben und Blättern ermittelt.

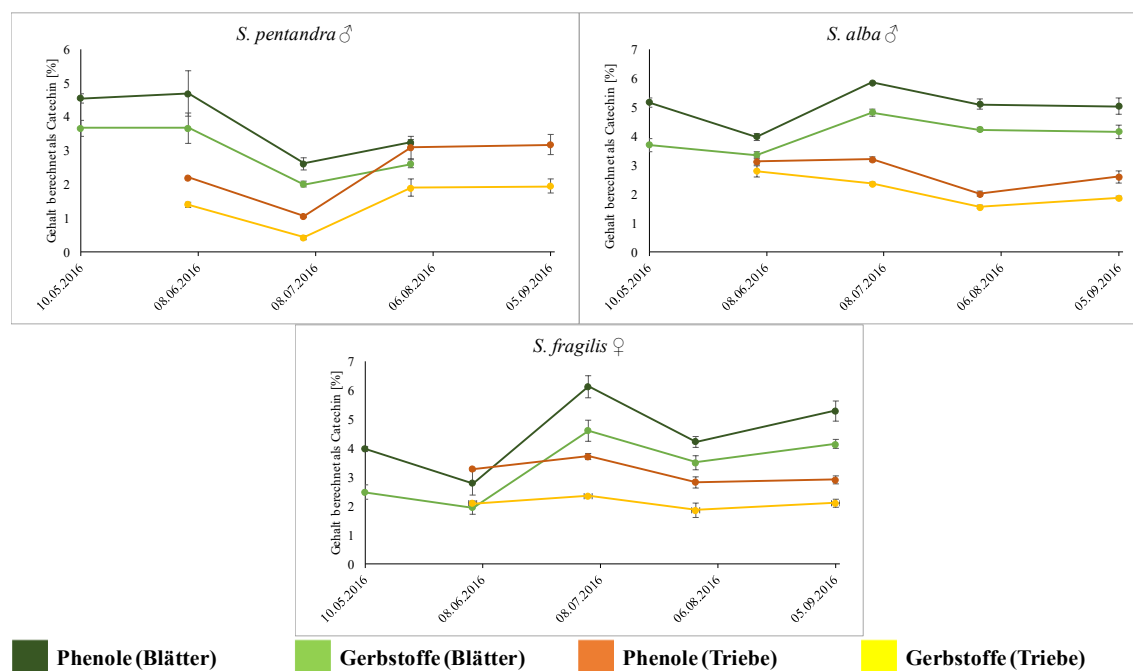


Abb. 6-2: Verlauf der Gehalte an Gesamtphenolen und -gerbstoffen bei den Vertretern des Subgenus *Salix*. Die Ergebnisse wurden durch eine modifizierte Hautpulvermethode (vgl., Kapitel 5.5.3) ermittelt. Die Berechnung erfolgte als Catechin und die Resultate sind in % [m/m] \pm SD (n = 3) angegeben.

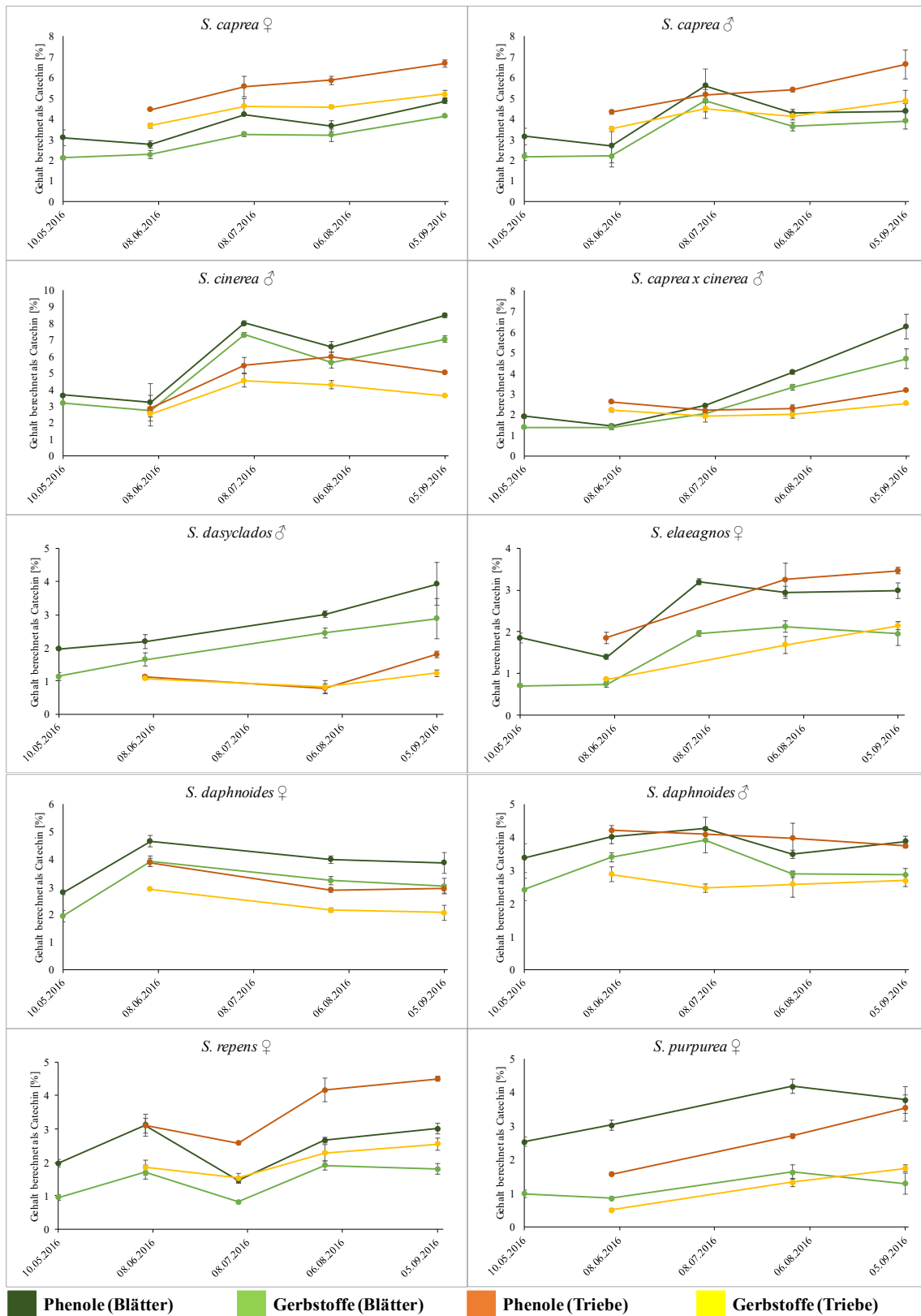


Abb. 6-3: Verlauf der Gehalte an Gesamtphenolen und -gerbstoffen bei den Vertretern des Subgenus *Vetrix*. Die Ergebnisse wurden durch eine modifizierte Hautpulvermethode (vgl., Kapitel 5.5.3) ermittelt. Die Berechnung erfolgte als Catechin und die Resultate sind in % [m/m] \pm SD (n = 3) angegeben.

Die meisten beprobten Weiden zeigten die höheren Werte für Phenole und Gerbstoffe in ihren Blättern. Ähnliche Konzentrationen in Trieben und Blättern zeigten die Gerbstoffe in *S. dasyclados* und *S. purpurea*, während *S. daphnoides* ♂ und *S. elaeagnos* in beiden Pflanzenorganen vergleichbare Konzentrationen aufwiesen. *S. repens* und *S. caprea* ♀ tendierten zur bevorzugten Speicherung oder Synthese phenolischer Verbindungen in den Trieben. *S. caprea* ♂ hatte auch letztere Tendenz, allerdings nicht so ausgeprägt wie das untersuchte ♀.

Betrachtet man die Unterschiede zwischen den Geschlechtern der Arten *S. caprea* und *S. daphnoides*, fallen keine großen Unterschiede auf. Lediglich die Verteilung der phenolischen Substanzen zwischen Blättern und Trieben scheint bei den ♂♂ homogener zu sein. Wohingegen die ♀♀ jeweils scheinbar einen Ablagerungsort bevorzugen. Diese Beobachtung muss aber noch an weiteren Beispielen untersucht werden.

6.2.2 Vergleichende Bewertung der Flavan-3-ol-Muster

In diesem Kapitel ist die detaillierte Untersuchung des gesamten Flavan-3-ol-Spektrums beschrieben. Zu dieser Stoffgruppe gehören zum einen monomere Verbindungen (z.B.: Catechin, Epicatechin) und zum anderen polymere Substanzen (kondensierte Gerbstoffe oder PAs). Da diese Gruppe eine sehr große Bandbreite diverser Vertreter zeigt, wurden die Proben mit zwei verschiedenen UPLC®-Methoden analysiert (RP-18: vgl. Kapitel 6.5.6; DIOL: vgl. Kapitel 6.5.5).

6.2.2.1 Erfassung der gesamten Flavan-3-ole über eine RP-18 UPLC®-Methode

Hier wurden zunächst die entsprechenden Peaks aus den RP-18-Chromatogrammen mit UV-Maxima > 274 nm und < 284 nm aus dem chromatographischen Fingerprint der Proben als Flavan-3-ole definiert und als Catechin quantifiziert (vgl. Kapitel 6.5.6 und Beispielchromatogramm mit UV-Spektrum in Abb. 6-56 aus demselben Kapitel). Um einen Überblick über die biosynthetische Diversität innerhalb der Flavan-3-ole zu gewinnen, wurde auch die Anzahl der detektierten Verbindungen aus den Chromatogrammen extrahiert. Dazu sind in **Tabelle 6-1** die detektierten maximalen und minimalen Konzentrationen während des Beobachtungszeitraums mit ihren zugehörigen Monaten aufgeführt. So wurden in den Proben der Blätter meist im Juli oder September die höchsten Gehalte gefunden. Dagegen wurden in den Trieben im Juni oder August die größten Konzentrationen an Flavan-3-olen in diesem Versuchsaufbau detektiert.

Tabelle 6-1: Maximale und minimale Flavan-3-ol-Gehalte in den untersuchten *Salix* Spezies. Die Daten wurden mit einer RP-18 UPLC[®] Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Um die Gesamtgehalte zu ermitteln, wurden die Konzentrationen aller Peaks aufsummiert. Die Ergebnisse sind als µmol Flavan-3-ole je g Droge, berechnet als Catechin aufgeführt.

		<i>S. pentandra</i> ♂	<i>S. alba</i> ♂	<i>S. fragilis</i> ♀	<i>S. caprea</i> ♀	<i>S. caprea</i> ♂	<i>S. caprea x cinerea</i> ♂	<i>S. cinerea</i> ♂	<i>S. dasyclados</i> ♂	<i>S. elaeagnos</i> ♀	<i>S. daphnoides</i> ♀	<i>S. daphnoides</i> ♂	<i>S. repens</i> ♀	<i>S. purpurea</i> ♀
Blätter	max Gehalt [µmol/g]	4,2	105,7	56,1	152,4	160,4	105,1	165,4	23,6	30,3	65,8	67,1	45,9	28,5
	max Monat	Juli	Mai	Sept.	Sept.	Juli	Aug.	Juli	Sept.	Juli	Juni	Sept.	Juni	Aug.
	min Gehalt [µmol/g]	0,9	68,8	12,9	66,4	71,3	7,9	38,5	12,2	6,8	42,8	39,2	8,2	12,9
	min Monat	Aug.	Sept.	Juni	Mai	Mai	Mai	Mai	Mai	Juni	Mai	Aug.	Juli	Mai
Triebe	max Gehalt [µmol/g]	25,5	80,8	42,8	239,4	184,1	23,8	25,3	8,9	53,4	136,0	142,6	88,9	194,0
	max Monat	Sept.	Juni	Juni	Aug.	Juli	Juni	Aug.	Juni	Aug.	Juni	Juli	Aug.	Sept.
	min Gehalt [µmol/g]	4,2	19,3	15,3	137,8	146,4	6,3	10,5	2,9	27,0	61,1	60,6	27,1	36,8
	min Monat	Juli	Sept.	Sept.	Juni	Juni	Juli	Juni	Aug.	Juni	Aug.	Sept.	Juli	Juni

Bzgl. der geringsten Konzentrationen dominierte in den Blättern klar der Mai und bei den Trieben war der Juni der Monat mit der geringsten Akkumulation der Flavan-3-ole.

In **Abb. 6-4** wurde die Verteilung der Flavan-3-ole zwischen Blättern und Trieben graphisch aufbereitet. Dazu wurden die über den Jahresverlauf erzielten Maximalwerte berücksichtigt. Hier stachen beide *S. caprea* Individuen heraus, die vergleichbare hohe Gehalte dieser Stoffklasse in beiden Geweben zeigten. Das *S. daphnoides* Pärchen zeigte eine noch höhere Übereinstimmung. In dieser Art wurden jedoch in beiden Organen weniger Flavan-3-ole detektiert. Allerdings waren bei allen drei Individuen in der Tendenz die Blätter der bevorzugte Ort der Akkumulation. *S. purpurea* zeichnete sich durch hohe Werte in den Trieben und verhältnismäßig niedrige Gehalte in den Blättern aus. Eine Gruppe mit recht gleichmäßiger Verteilung zwischen den beiden untersuchten Geweben, jedoch mit insgesamt niedrigeren detektierten Gehalten setzte sich aus diesen Weiden zusammen: *S. repens*, *S. alba*, *S. elaeagnos*, *S. fragilis*, *S. pentandra* und *S. dasyclados*. Da *S. caprea x cinerea* und *S. cinerea* beide höhere Konzentrationen in den Blättern als in den Trieben zeigten und sich die Werte in einem ähnlichen Bereich befanden, kann aufgrund dieser Betrachtungsweise eine größere Ähnlichkeit des Hybrids mit *S. cinerea* postuliert werden. Die Jahresverläufe aus diesen Untersuchungen sind in

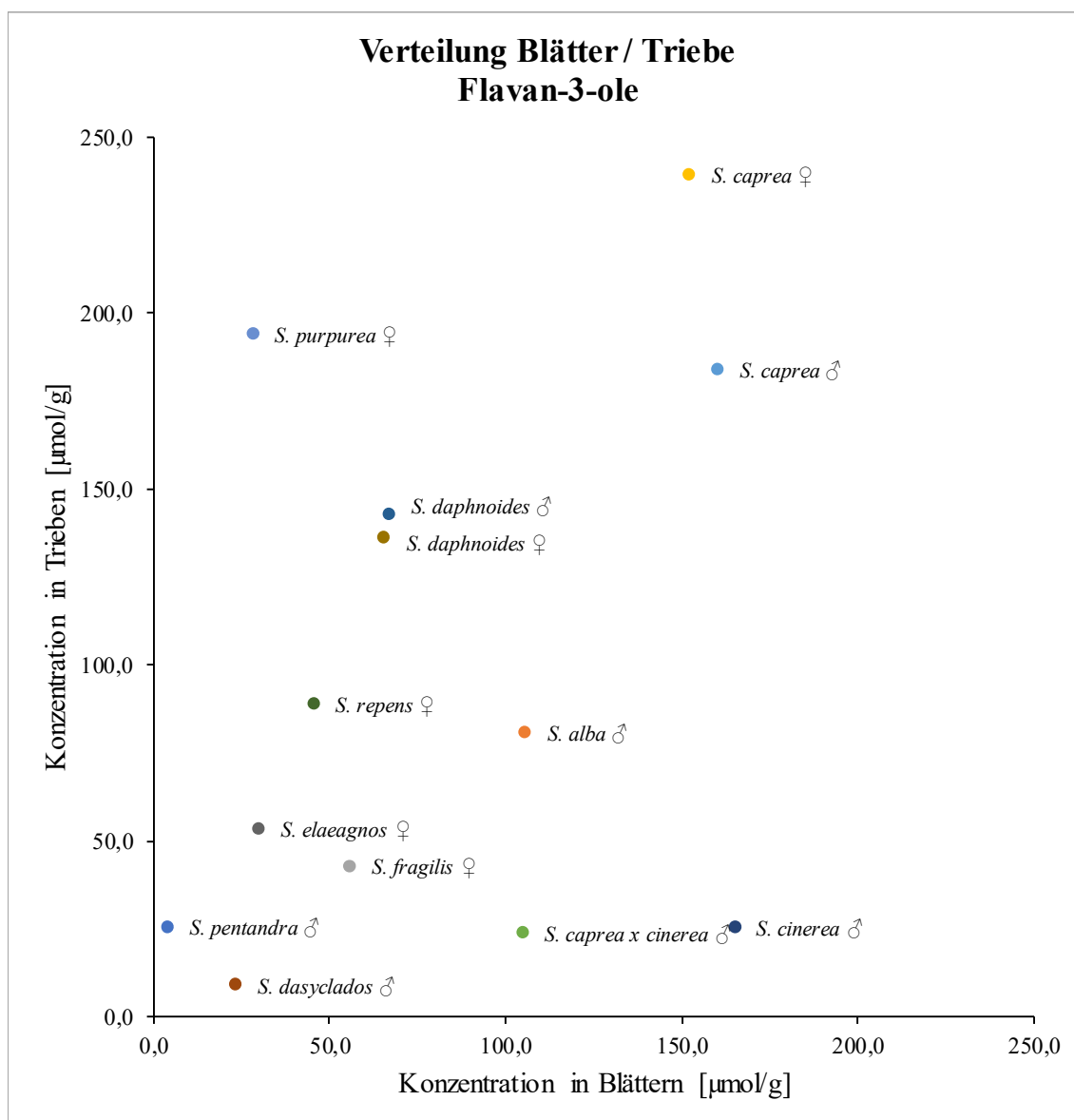


Abb. 6-4: Graphische Darstellung der Verteilung der Flavan-3-ole zwischen den Blättern und Trieben. In dieser Darstellung wurden die maximalen Werte für jede Probe berücksichtigt, die während der Wachstumsaison erreicht wurden. Die Konzentrationen sind in µmol Flavan-3-ole je g Droge, berechnet als Catechin angegeben.

Abb. 6-5 - 6-8 gezeigt. Nach diesen Ergebnissen können die Individuen in zwei Gruppen aufgeteilt werden. So zeigten *S. pentandra*, beide *S. caprea*, *S. elaeagnos*, *S. repens*, beide *S. daphnoides* und *S. purpurea* die Triebe als bevorzugten Ort für die Akkumulierung. *S. alba*, *S. cinerea*, *S. caprea x cinerea* und *S. dasyclados* bevorzugten hingegen die Blätter. Im Fall von *S. fragilis* wechselte interessanterweise der bevorzugte Ablagerungsort. So waren im Juni und Juli noch die Triebe bevorzugt, im August waren die Konzentrationen bereits in beiden Organen gleich auf und im September wurde die deutlich höhere Konzentration an Flavan-3-

olen in den Blättern detektiert. Vergleicht man die Anzahl detektierter Verbindungen mit den aufsummierten Konzentrationen, muss festgestellt werden, dass beide Verläufe in allen Arten miteinander korreliert sind.

Vergleicht man die maximalen Konzentrationen, die von den einzelnen Individuen im Jahresverlauf erreicht wurden treten deutliche Unterschiede zu Tage. So wurden in *S. alba* (nur Blätter), beiden *S. caprea*, *S. cinerea* (nur Blätter), *S. caprea* x *cinerea* (nur Blätter), beiden *S. daphnoides* (nur Triebe) und *S. purpurea* (nur Triebe) Werte > 100 µmol/g detektiert. In allen anderen Spezies, wurden teilweise deutlich niedrigere Gehalte festgestellt.

Stellt man die Verläufe der Geschlechter (*S. caprea*, *S. daphnoides*) gegenüber, sind ähnliche Jahresverläufe und auch Konzentrationsbereiche festzustellen. Deutlichere Rückschlüsse lässt der Vergleich des Hybriden *S. caprea* x *cinerea* mit seinen Eltern zu. Da sich, wie weiter oben beschrieben, das bevorzugte Organ zur Anreicherung der Flavan-3-ole bei *S. cinerea* und *S. caprea* unterscheiden, ist eine bedeutende Frage, wie es sich bei dem Bastard verhält. Da dieser auch deutlich die Blätter bevorzugt, scheinen hier die Einflüsse der *S. cinerea* auf die Biosyntheseleistung der Flavan-3-ole stärker ausgeprägt zu sein.

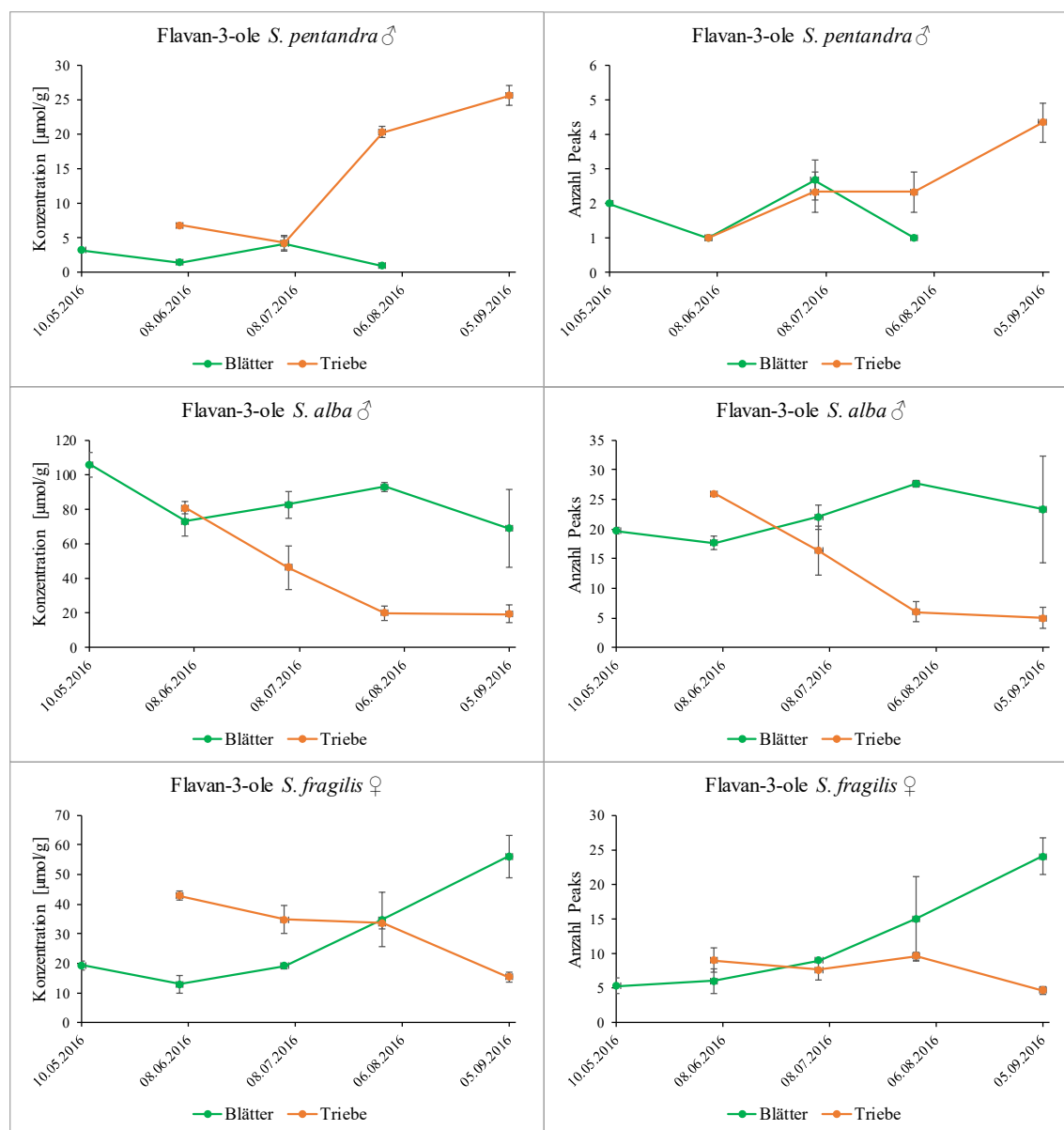


Abb. 6-5: Übersicht zum Jahresverlauf der Flavan-3-ole bei den Vertretern des Subgenus *Salix*. Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC[®] RP-18 Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Auf der linken Seite sind die Konzentrationsverläufe in μmol Analyt je g Drogenmaterial \pm SD ($n = 3$), berechnet als Catechin aufgeführt. Die rechte Seite zeigt die Anzahl \pm SD ($n = 3$) berücksichtigter Peaks in den Proben.

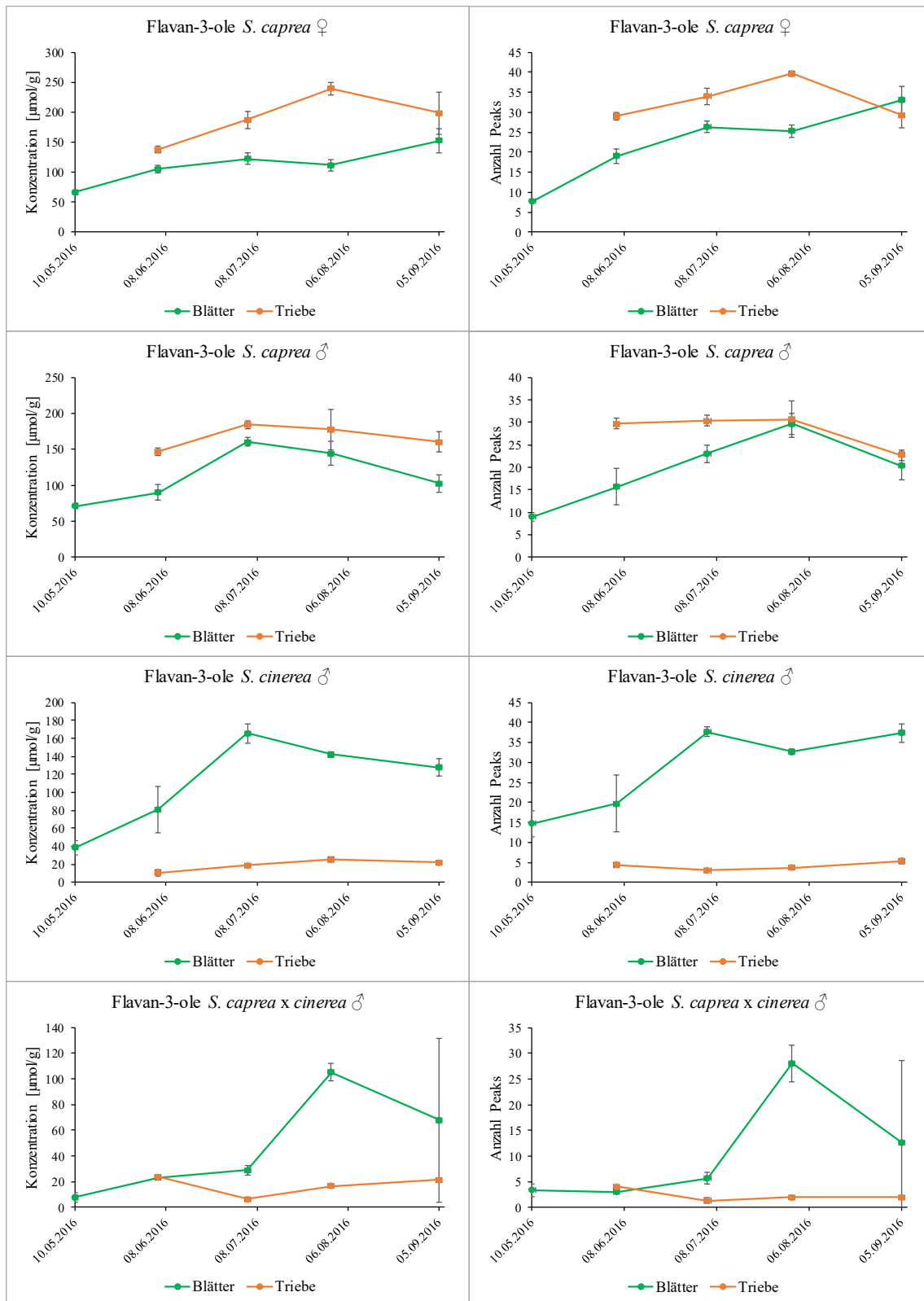


Abb. 6-6: Übersicht zum Jahresverlauf der Flavan-3-ole bei den Vertretern des Subgenus *Vetrix* und Sektion *Vetrix*. Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC® RP-18 Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Auf der linken Seite sind die Konzentrationsverläufe in μmol Analyt je g Drogenmaterial \pm SD ($n = 3$), berechnet als Catechin aufgeführt. Die rechte Seite zeigt die Anzahl \pm SD ($n = 3$) berücksichtigter Peaks in den Proben.

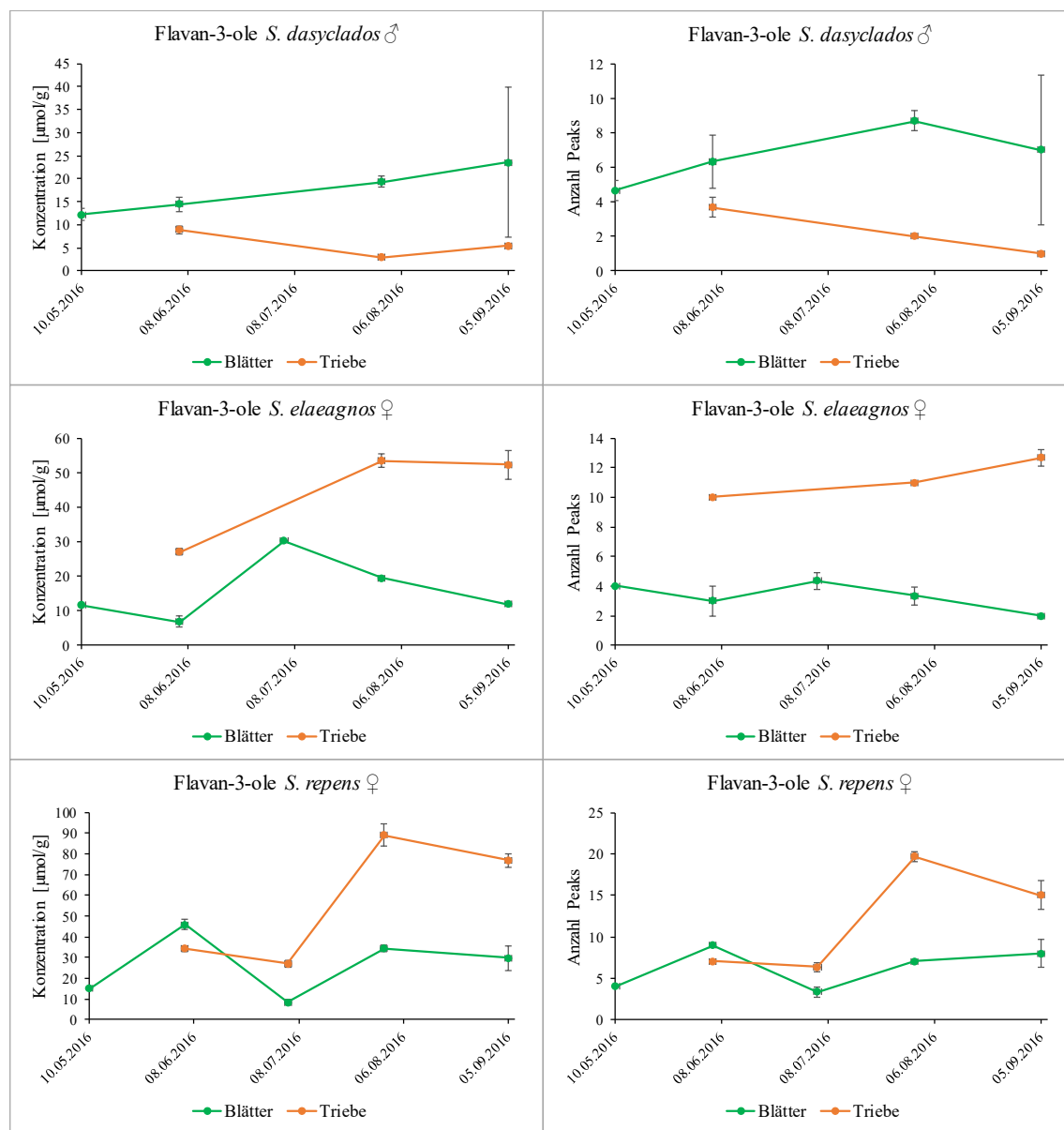


Abb. 6-7: Übersicht zum Jahresverlauf der Flavan-3-ole bei den Vertretern des Subgenus *Vetrix* und Sektionen *Vimen* (*S. dasyclados*), *Canae* (*S. elaeagnos*) und *Incubaceae* (*S. repens*). Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC[®] RP-18 Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Auf der linken Seite sind die Konzentrationsverläufe in μmol Analyt je g Drogenmaterial \pm SD ($n = 3$), berechnet als Catechin aufgeführt. Die rechte Seite zeigt die Anzahl \pm SD ($n = 3$) berücksichtigter Peaks in den Proben.

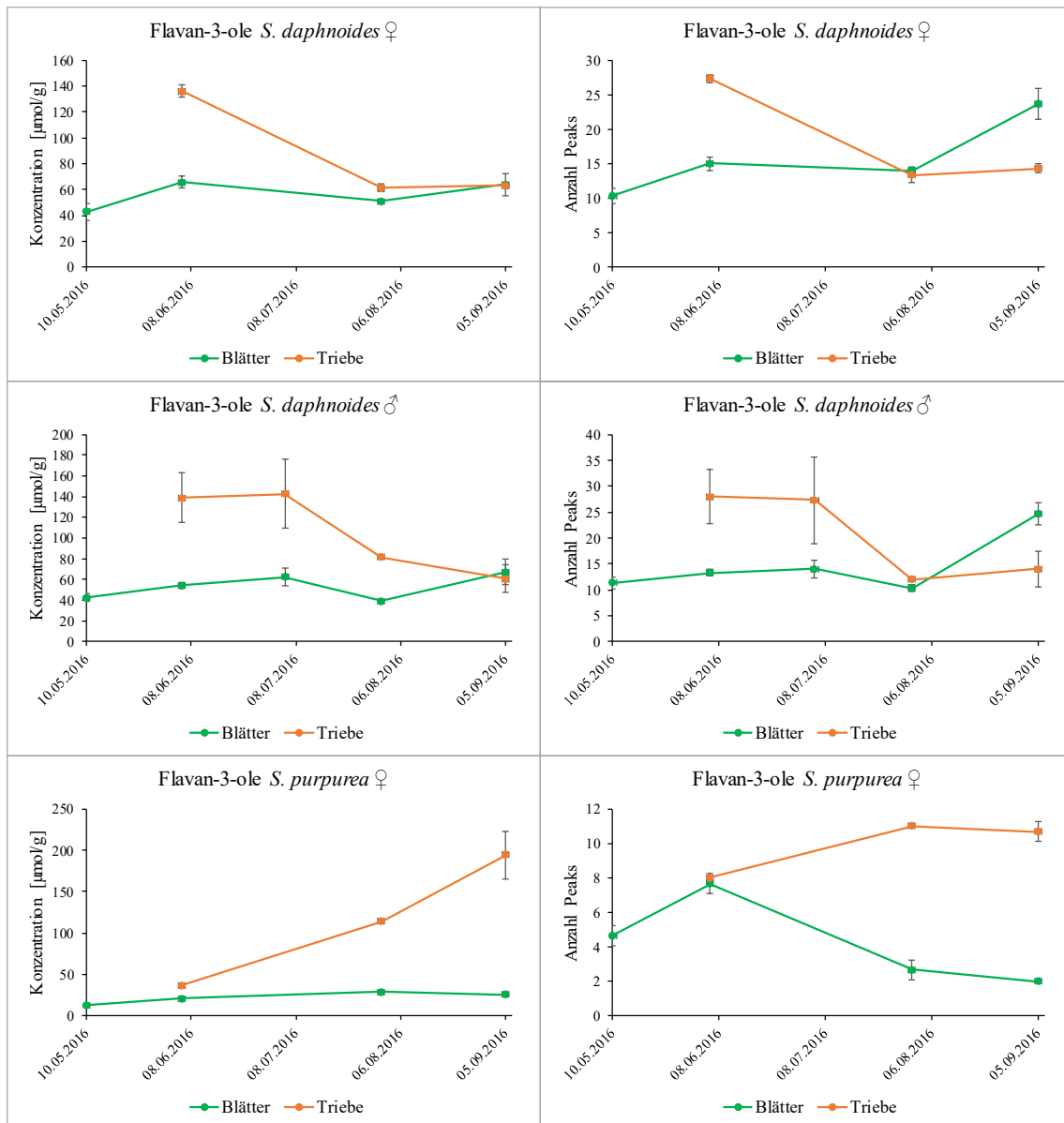


Abb. 6-8: Übersicht zum Jahresverlauf der Flavan-3-ole bei den Vertretern des Subgenus *Vetrix* und Sektionen *Daphnella* (*S. daphnoides*) und *Helix* (*S. purpurea*). Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC® RP-18 Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Auf der linken Seite sind die Konzentrationsverläufe in μmol Analyt je g Drogenmaterial \pm SD ($n = 3$), berechnet als Catechin aufgeführt. Die rechte Seite zeigt die Anzahl \pm SD ($n = 3$) berücksichtigter Peaks in den Proben.

6.2.2.2 Quantifizierung der monomeren Flavan-3-ole Catechin und Epicatechin

Gerade in Bezug auf die PAs zeigen frühere Arbeiten, dass im Falle der Gattung *Salix* hauptsächlich Catechin und Epicatechin als monomere Bausteine gefunden werden können (Déprez et al., 1999; Esatbeyoglu et al., 2010; Jürgenliemk et al., 2007; Kolodziej, 1990; Poblocka-Olech und Krauze-Baranowska, 2008). Daher wurden diese beiden Flavan-3-ole über Referenzsubstanzen identifiziert und deren Konzentrationen gesondert erfasst (**Abb. 6-9** bis **Abb. 6-11**). Bei allen Arten konnte gezeigt werden, dass in den Trieben das Catechin in deutlich höheren Konzentrationen zu finden ist. Dagegen zeigt das Epicatechin keine nennenswerten Konzentrationen in diesem Pflanzenorgan. Betrachtet man die Vertreter des Subgenus *Vetrix*, kann ebenfalls das Catechin als bevorzugt gegenüber Epicatechin genannt werden. Wie bereits bei der Gesamtübersicht zu den Flavan-3-olen gezeigt wurde, spiegelt auch der Vergleich dieser beiden Verbindungen das gleiche Bild wider, vergleicht man den Hybrid mit seinen Eltern. So wurden im Gegensatz zu den beiden *S. caprea* Individuen bei *S. cinerea* und *S. caprea* x *cinerea* die höheren Catechin-Konzentrationen in den Blättern detektiert. Im Vergleich der Geschlechter konnten weder bei dem *S. caprea*- noch bei dem *S. daphnoides*-Pärchen verwertbare Unterschiede gezeigt werden. Nur wenige Individuen zeigten in den Blättern das Epicatechin als hauptsächlich vorkommendes monomeres Flavan-3-ol. Das war der Fall bei *S. alba*, *S. fragilis* und beiden *S. daphnoides* Individuen. Weiter konnte noch festgestellt werden, dass in allen diesen Weiden die Epicatechin-Konzentrationen besonders zwischen den letzten beiden Probenzügen rückläufig waren. Lediglich *S. fragilis* zeigte hier kontinuierliche, aber niedrige Werte. Die Konzentrationskurven des Catechins bei *S. alba* sind hingegen recht konstant, bei *S. fragilis* und *S. daphnoides* war auch hier eine fallende Tendenz auszumachen.

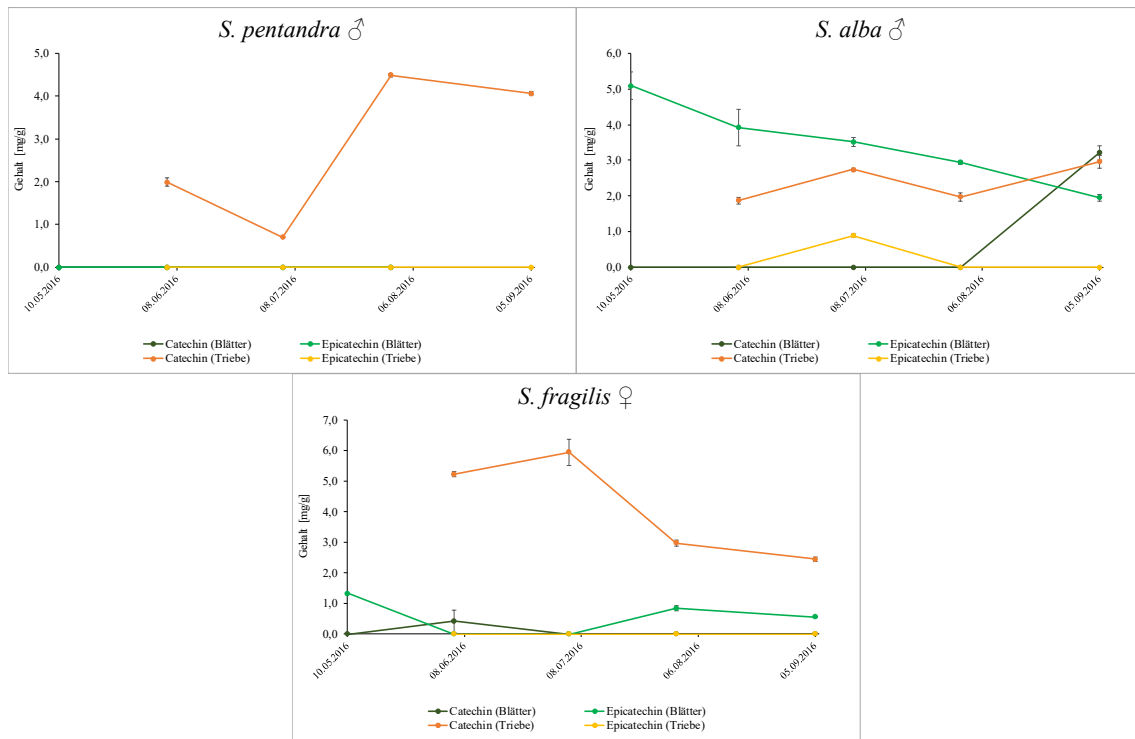


Abb. 6-9: Übersicht zum Jahresverlauf des Catechins und Epicatechins bei den Vertretern des Subgenus *Salix*. Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC[®] RP-18 Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Die Gehalte sind in mg PAs je g Drogenmaterial \pm SD (n = 3), berechnet als Catechin angegeben.

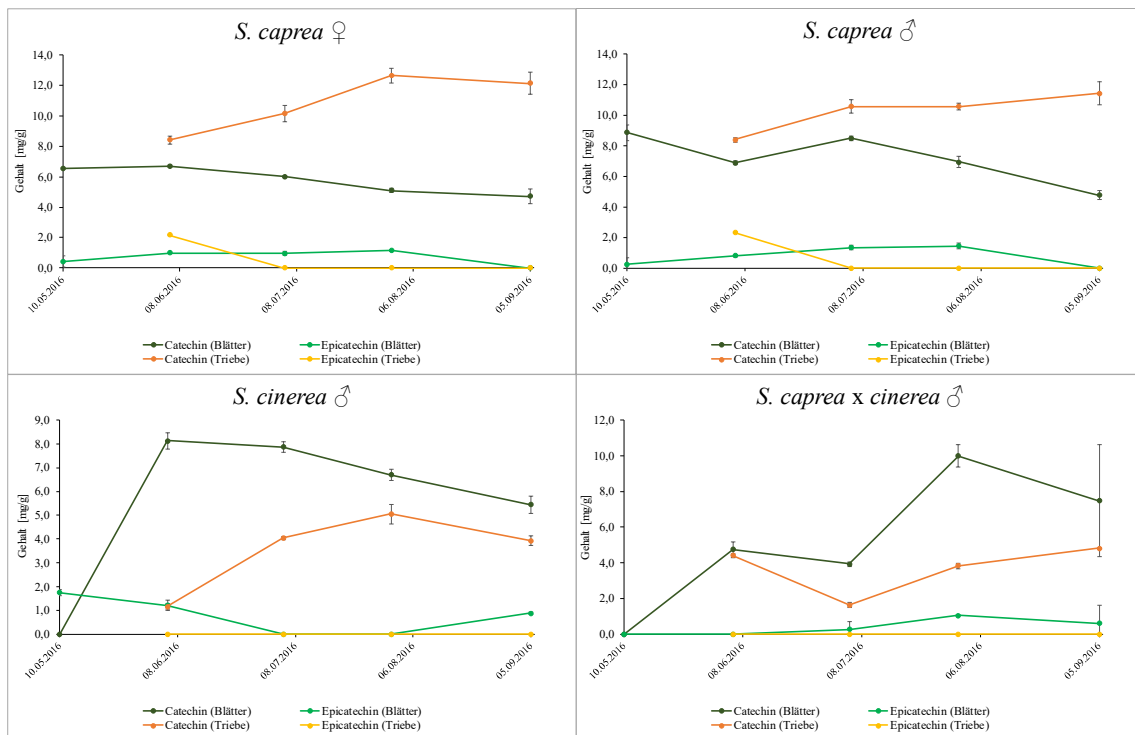


Abb. 6-10: Übersicht zum Jahresverlauf des Catechins und Epicatechins bei den Vertretern des Subgenus *Vetrix* und Sektion *Vetrix*. Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC[®] RP-18 Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Die Gehalte sind in mg PAs je g Drogenmaterial \pm SD (n = 3), berechnet als Catechin angegeben.

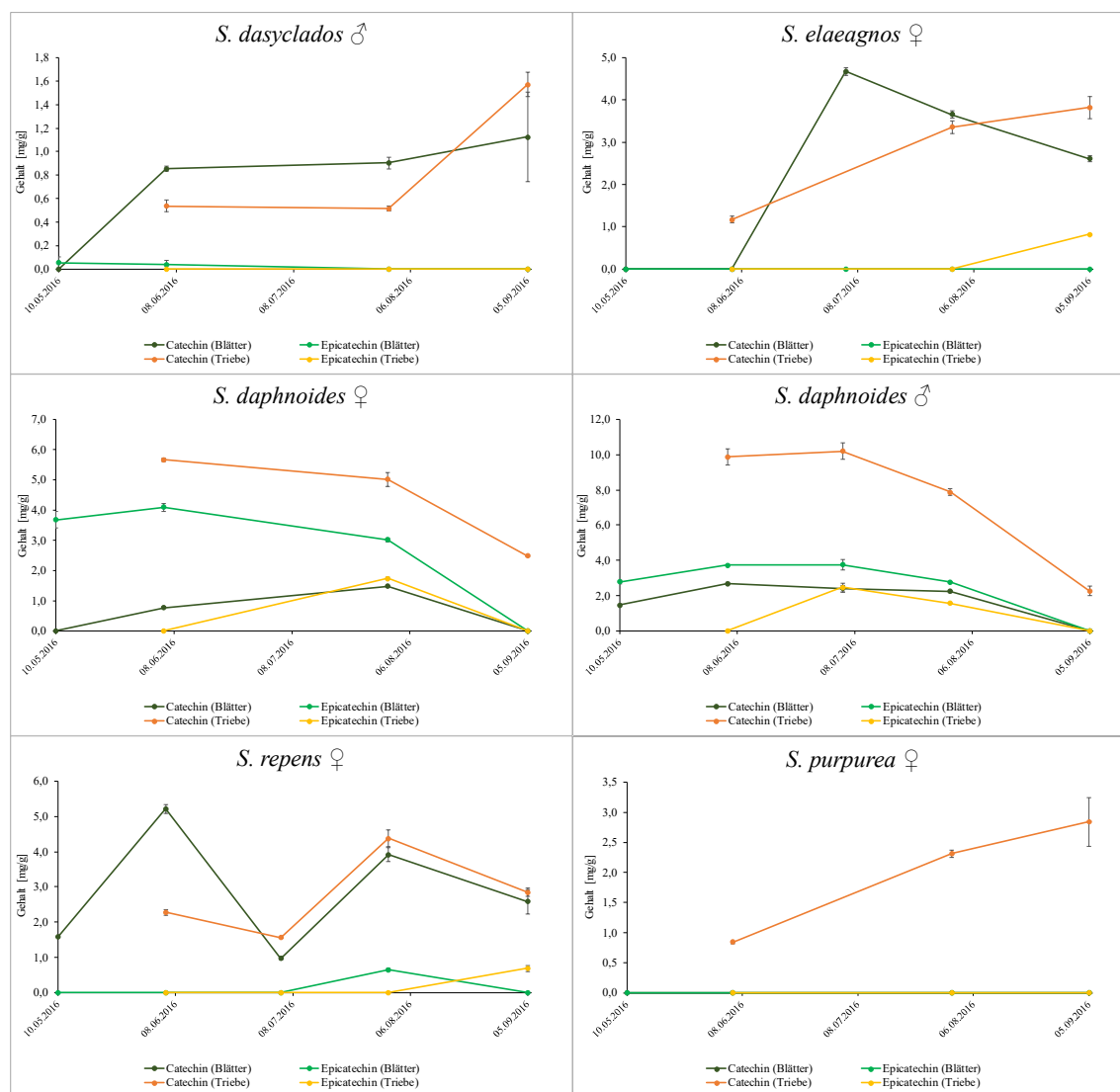


Abb. 6-11: Übersicht zum Jahresverlauf des Catechins und Epicatechins bei den Vertretern des Subgenus *Vetrix* und Sektionen *Vimen* (*S. dasyclados*), *Canae* (*S. elaeagnos*), *Daphnella* (*S. daphnoides*), *Incubaceae* (*S. repens*) und *Helix* (*S. purpurea*). Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC[®] RP-18 Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Die Gehalte sind in mg PAs je g Drogenmaterial \pm SD (n = 3), berechnet als Catechin angegeben.

6.2.2.3 Erfassung der Proanthocyanidine via einer DIOL-UPLC[®]-Methode

Die PAs wurden genauer mit einer weiteren UPLC[®] Methode untersucht (Hellenbrand et al., 2015b), die es erlaubt, diese Verbindungen mit aufsteigendem DP als Cluster zu eluieren. Dabei nutzt man ein spezifisches und sensitives Detektionsprinzip über die Fluoreszenz der PAs, bzw. Flavan-3-ole ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 316 \text{ nm}$) (Kapitel 6.5.5). Um einen ersten Überblick zu bekommen, wurden die gesamten PA-Konzentrationen für jede Probe ermittelt (Abb. 6-12 bis Abb. 6-14). Zunächst sollen auch hier die Ablagerungsorte betrachtet werden. Bei nahezu allen Arten scheinen demnach die Triebe begünstigt zu sein. Bei *S. alba*, *S. fragilis*, *S. cinerea*,

S. caprea x *cinerea*, *S. dasyclados* und beiden *S. daphnoides* waren über den gesamten Zeitraum fast immer höhere Konzentrationen in den Blättern zu finden. Bei beiden *S. caprea* Individuen gab es keine deutliche Präferenz für die Verteilung der PAs. Hier kam es sogar zu einem Wechsel des Ablagerungsortes, vor allem gegen Ende des Beobachtungszeitraums. Bei allen anderen Arten waren die Triebe begünstigt. Diese Beobachtung zeigte nun ebenfalls wieder eine stärkere Korrelation zwischen *S. caprea* x *cinerea* und *S. cinerea*, was wiederum die vorher präsentierten Ergebnisse bestätigte. Der Hybrid zeigt des Weiteren auch bei den detektierten Konzentrationen größere Übereinstimmung mit *S. cinerea*. *S. caprea* x *cinerea* steigert in seinen Blättern den Gehalt kontinuierlich bis August, gefolgt von einem starken Abfall zum September. Beide *S. caprea* Individuen und *S. cinerea* zeigen Ähnlichkeiten, in Hinblick auf die gemessenen Konzentrationsmaxima. In allen drei Fällen wurde in den Trieben im August und bei den Blättern im Juli der höchste Wert festgestellt. Nach dieser Klimax folgt stets ein kontinuierlicher Rückgang der PAs, der in den Trieben der *S. caprea* ♀ und *S. cinerea* am deutlichsten wird.

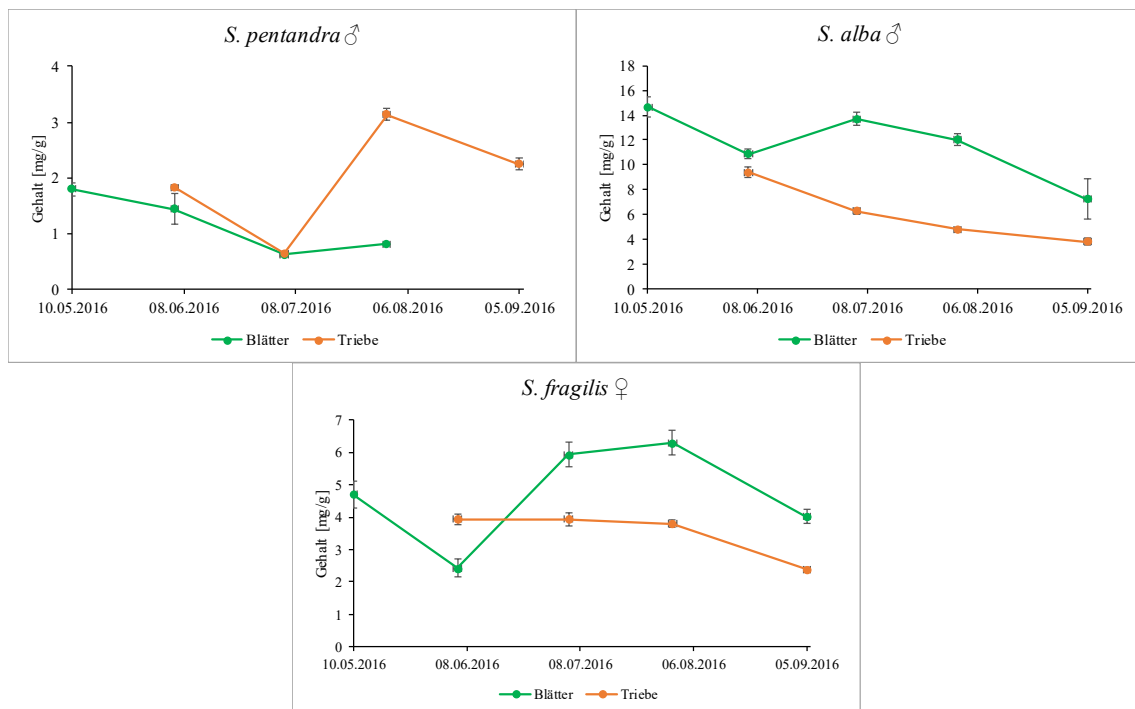


Abb. 6-12: Übersicht zum Jahresverlauf der aufsummierten PAs bei den Vertretern des Subgenus *Salix*. Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC[®] DIOL (Hellenbrand et al., 2015b; Kapitel 6.5.5) Methode erhoben. Die Gehalte sind in mg PAs je g Drogenmaterial \pm SD ($n = 3$), berechnet als Catechin angegeben.

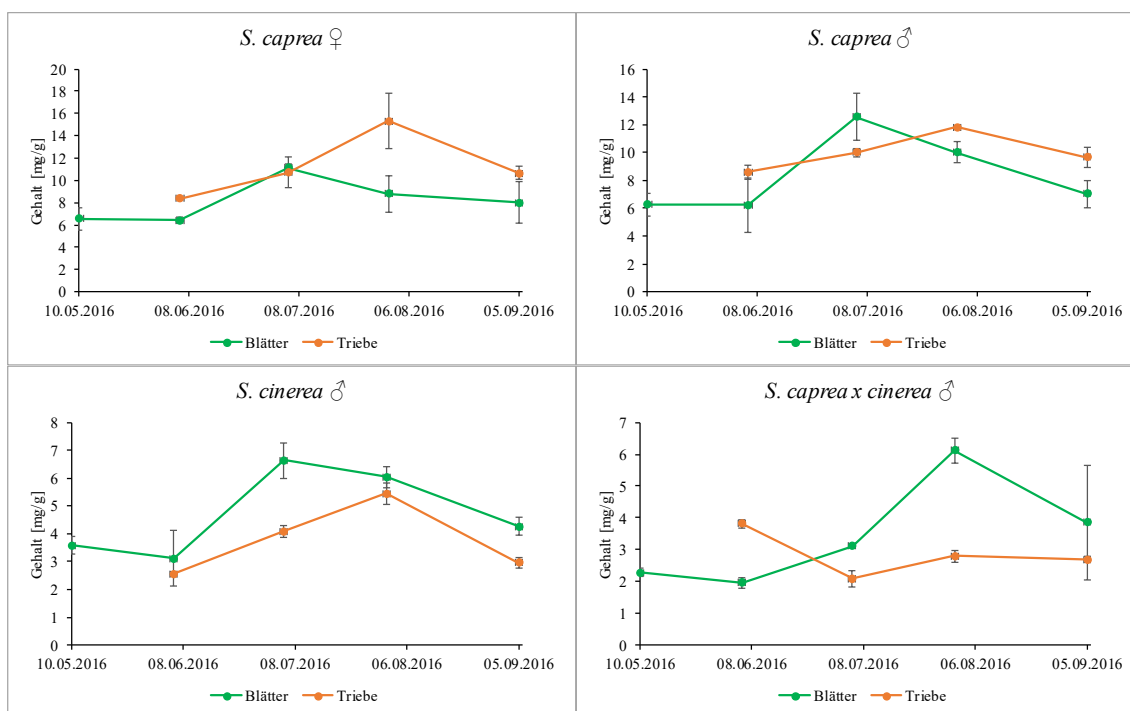


Abb. 6-13: Übersicht zum Jahresverlauf der aufsummierten PAs bei den Vertretern des Subgenus *Vetrix* und Sektion *Vetrix*. Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC[®] DIOL (Hellenbrand et al., 2015b; Kapitel 6.5.5) Methode erhoben. Die Gehalte sind in mg PAs je g Drogenmaterial \pm SD (n = 3), berechnet als Catechin angegeben.

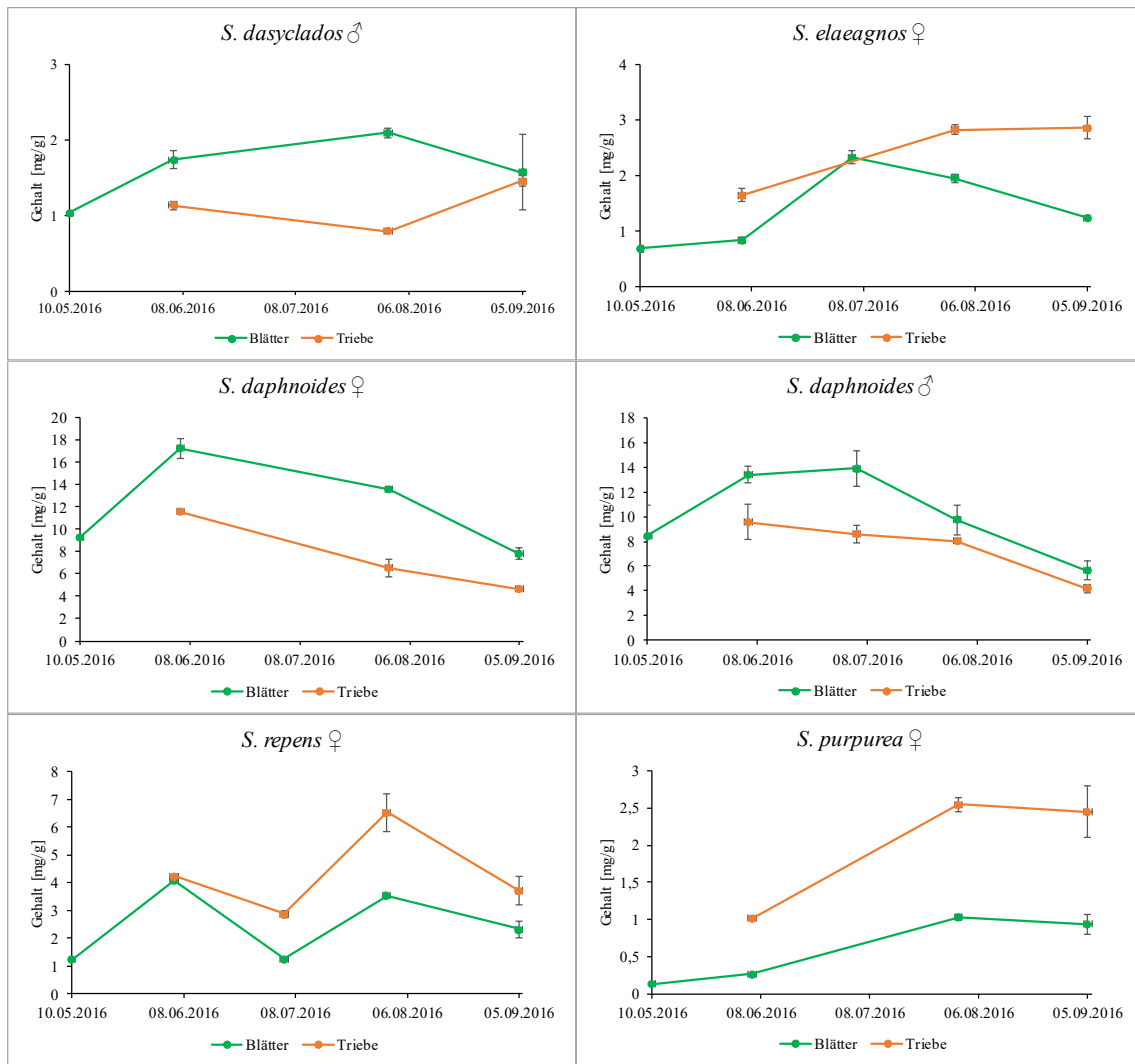


Abb. 6-14: Übersicht zum Jahresverlauf der aufsummierten PAs bei den Vertretern des Subgenus *Vetrix* und Sektionen *Vimen* (*S. dasyclados*), *Canae* (*S. elaeagnos*), *Daphnella* (*S. daphnoides*), *Incubaceae* (*S. repens*) und *Helix* (*S. purpurea*). Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC[®] DIOL Methode (Hellenbrand et al., 2015b; Kapitel 6.5.5) erhoben. Die Gehalte sind in mg PAs je g Drogenmaterial \pm SD ($n = 3$), berechnet als Catechin angegeben.

6.2.2.4 Erfassung der Minima und Maxima der Proanthocyanidine während des Untersuchungszeitraums

In **Tabelle 6-2** sind die minimalen und maximalen Konzentrationen an PAs zusammen mit den jeweiligen Monaten der Detektion aus den gezeigten Jahresverläufen (vgl. Kapitel 6.2.2.3) extrahiert. Dadurch kann zwischen Weiden differenziert werden, die verhältnismäßig große Mengen an PAs produzieren. Als Grenze für diese Betrachtung soll ein Gehalt von 10 mg/g PAs angesehen werden. Dieser Wert wird in folgenden Proben überschritten: *S. alba* (Blätter: Mai), beide *S. caprea* (Blätter: Juli, Triebe: August), *S. daphnoides* ♀ (Blätter: Juni, Triebe: Juni), *S. daphnoides* ♂ (Blätter: Juli). Die kleinsten Werte wurden bei *S. purpurea* in den Trieben

festgestellt (0,1 – 1,0 mg/g). Weiter wurden maximal Gehalte < 2,0 mg/g in *S. pentandra* (Blätter: Mai) und *S. dasyclados* (Triebe: September) gefunden. In den Blättern konnten die niedrigsten Gehalte meist im Juni detektiert werden, während die maximal Werte (mit einer leichten Präferenz für das Ende der Saison) relativ gleichmäßig verteilt sind. Im Gegensatz dazu wurden in den Trieben die größten Gehalte im Juni oder August ermittelt, während die niedrigsten entweder im Juni oder September bestimmt wurden.

In **Abb. 6-15** ist eine graphische Aufbereitung der Konzentrationsverhältnisse zwischen Blättern und Trieben zu finden. Dabei fallen zwei Gruppen auf. Die eine beinhaltet *Salix* Spezies mit niedrigen Gehalten in beiden Pflanzenorganen (*S. repens*, *S. cinerea*, *S. fragilis*, *S. caprea* x *cinerea*, *S. pentandra*, *S. elaeagnos*, *S. purpurea*, *S. dasyclados*). Die zweite Gruppe zeichnet sich durch hohe Gehalte in Blättern und Trieben aus (beide *S. caprea*, beide *S. daphnoides*, *S. alba*). So zeigt der Hybrid *S. caprea* x *cinerea* bei dieser Betrachtung eine größere Ähnlichkeit zu *S. cinerea*, zumal sich beide in der erstgenannten Gruppe befinden. Innerhalb des Subgenus *Salix* sind in der ersten Gruppe *S. fragilis* und *S. pentandra* zu finden, wohingegen *S. alba* in beiden Geweben deutlich höhere Konzentrationen aufweist. Zwischen den Geschlechtern konnte diese Aufbereitung der Daten in beiden Pärchen keine nennenswerten Unterschiede zu Tage fördern.

Tabelle 6-2: Maximale und minimale PA-Gehalte in den untersuchten *Salix* Spezies. Die Daten wurden mit einer UPLC[®] Methode erhoben (Hellenbrand et al., 2015b; Kapitel 6.5.5). Um die Gesamtgehalte zu ermitteln, wurden die Konzentrationen aller Cluster aufsummiert. Die Ergebnisse sind als mg PAs je g Droge, berechnet als Catechin aufgeführt.

		<i>S. pentandra</i> ♂	<i>S. alba</i> ♂	<i>S. fragilis</i> ♀	<i>S. caprea</i> ♀	<i>S. caprea</i> ♂	<i>S. caprea</i> x <i>cinerea</i> ♂	<i>S. cinerea</i> ♂	<i>S. dasyclados</i> ♂	<i>S. elaeagnos</i> ♀	<i>S. daphnoides</i> ♀	<i>S. daphnoides</i> ♂	<i>S. repens</i> ♀	<i>S. purpurea</i> ♀
Blätter	max Gehalt [mg/g]	1,8	14,7	6,3	11,1	12,6	6,1	6,6	2,1	2,3	17,2	13,9	4,1	1,0
	max Monat	Mai	Mai	Aug.	Juli	Juli	Aug.	Juli	Aug.	Juli	Juni	Juli	Juni	Aug.
	min Gehalt [mg/g]	0,6	7,3	2,4	6,4	6,2	2,0	3,1	1,0	0,7	7,8	5,6	1,2	0,1
	min Monat	Juli	Sept.	Juni	Juni	Juni	Juni	Juni	Mai	Mai	Sept.	Sept.	Mai	Mai
Triebe	max Gehalt [mg/g]	3,1	9,4	3,9	15,3	11,8	3,8	5,5	1,5	2,9	11,6	9,6	6,5	2,6
	max Monat	Aug.	Juni	Juni	Aug.	Aug.	Aug.	Aug.	Sept.	Sept.	Juni	Juni	Aug.	Aug.
	min Gehalt [mg/g]	0,6	3,8	2,4	8,3	8,6	2,1	2,6	0,8	1,6	4,7	4,2	2,9	1,0
	min Monat	Juli	Sept.	Sept.	Juni	Juni	Juli	Juni	Aug.	Juni	Sept.	Sept.	Sept.	Juni

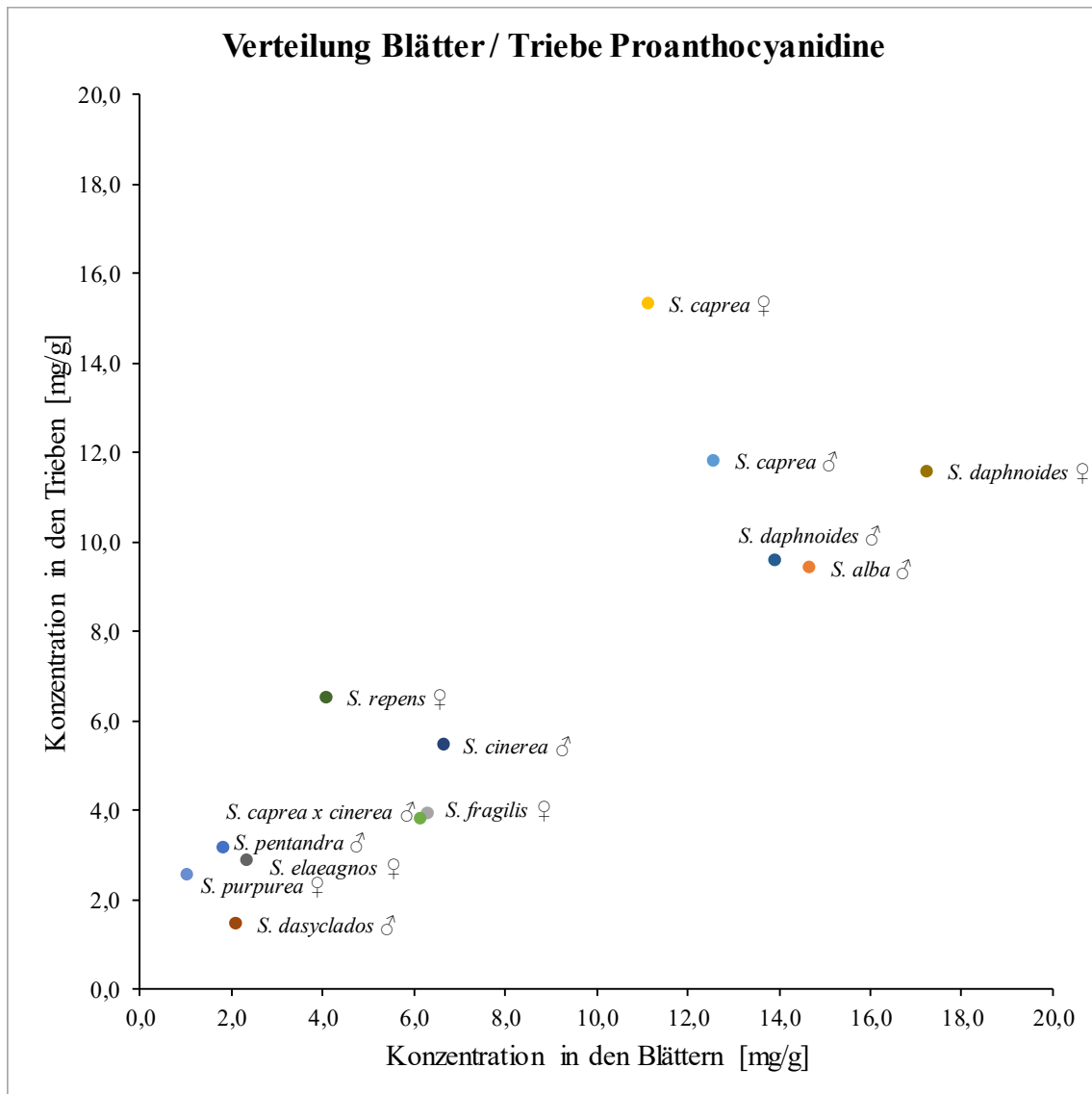


Abb. 6-15: Graphische Darstellung der Verteilung der Gesamt-PAs zwischen den Blättern und Trieben. In dieser Darstellung wurden die maximalen Werte für jede Probe berücksichtigt, die während der Wachstumsaison erreicht wurden. Die Konzentrationen sind in mg PAs je g Droge, berechnet als Catechin angegeben.

6.2.2.5 Betrachtung des Anteils oligomerer Proanthocyanidine innerhalb der Gesamt-Proanthocyanidine

In **Abb. 6-16** sind die prozentualen Anteile der oligomeren PAs (DP 2 – 10) zu den gesamten PAs (oligomere + polymere PAs) gezeigt. Im Großen und Ganzen sind diese Werte bei den meisten Weiden über den Jahresverlauf recht konstant. Ausnahmen mit steigenden oligomeren Anteilen sind: *S. pentandra* (Triebe: 65-81%), *S. alba* (Triebe: 50-63%), *S. cinerea* (Blätter: 51-64%, Triebe: 45-60%), *S. caprea x cinerea* (Blätter: 69-81%, Triebe: 69-74%),

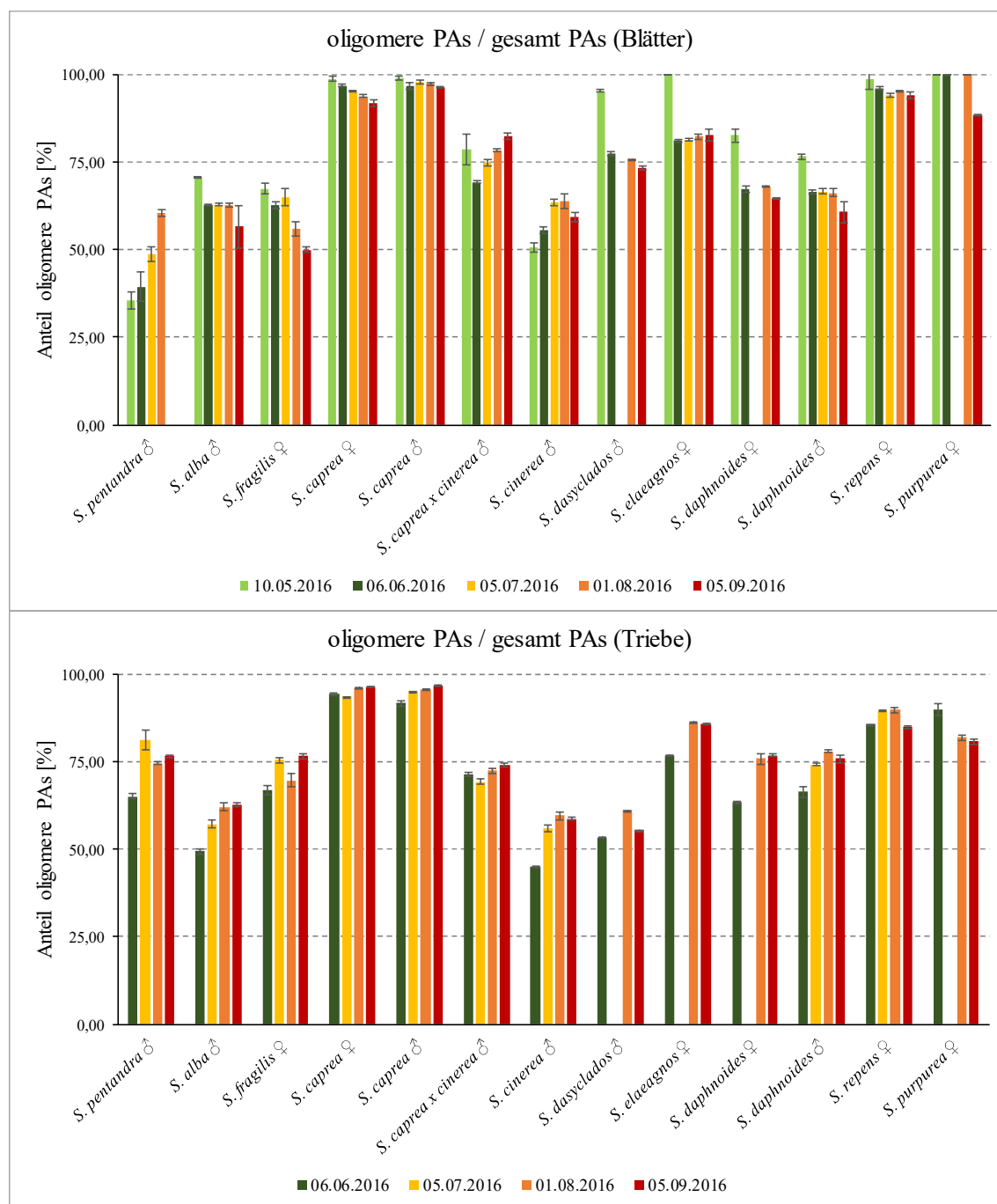


Abb. 6-16: Prozentuale Anteile der oligomeren PAs (DP 2 – 10) im Verhältnis zu den gesamten PAs (oligomere + polymere PAs). Die gesamten PAs wurden in jeder Probe auf 100% gesetzt. Die zugrundeliegenden Daten wurden mit einer UPLC® DIOL Methode (Hellenbrand et al., 2015b; Kapitel 6.5.5) erhoben. Die Angabe erfolgt in % \pm SD (n = 3).

S. daphnoides ♀ (Triebe: 63-77%) und ♂ (Triebe: 66-78%). Abfallende Anteile wurden in diesen Proben festgestellt: *S. alba* (Blätter: 71-57%), *S. fragilis* (Blätter: 67-50%), *S. dasyclados* (Blätter: 95-73%), *S. elaeagnos* (Blätter: 100-81%), *S. daphnoides* ♀ (Blätter: 83-65%) und ♂ (Blätter: 77-61%). Besonders stachen *S. pentandra*, beide *S. caprea* Geschlechter, *S. purpurea*, *S. dasyclados* und *S. elaeagnos* heraus. In den Blättern bei beiden letztgenannten wurden im Mai sehr hohe Anteile oligomerer PAs registriert ($\geq 95\%$). Bereits im Juni fielen die Werte sprunghaft ab und pendelten sich auf einem konstanten Niveau bis zum September ein. Bei beiden *S. daphnoides* Individuen war in den Blättern selbiges Verhalten zu verzeichnen, allerdings nicht in dieser ausgeprägten Art. Im Falle der *S. pentandra* konnte eine verhältnismäßig große Differenz zwischen Blättern (35-61%) und Trieben (65-81%) ausgemacht werden. Damit war diese Weide diejenige innerhalb des untersuchten Probensets mit den geringsten oligomeren Anteilen in den Blättern, da die 50%-Marke von keiner anderen Art unterschritten wurde. Jedoch konnte ein kontinuierlicher Anstieg dieser Fraktion über den gesamten Beobachtungszeitraum gezeigt werden. Die beiden Geschlechter der *S. caprea* zeigten sowohl in den Trieben als auch in den Blättern die oligomeren PAs als dominierende Cluster, da deren Anteile niemals $< 90\%$ waren. Ein ähnliches Bild stellten die Blätter der *S. purpurea* dar, während sich in den Trieben Übereinstimmung mit dem Großteil der anderen Arten herauskristallisierte.

6.2.2.6 Betrachtung der Proanthocyanidinmuster

Als letzte und detaillierteste Betrachtung sollen an dieser Stelle die PA-Muster der einzelnen Individuen über alle DPs verglichen werden. Diese Muster sind in **Abb. 6-17** bis **Abb. 6-20** aufgeführt. So zeigt **Abb. 6-17** die Vertreter des Subgenus *Salix* (Skvortsov und Zinovjev, 1999) mit den Sektionen *Pentandrae* (*S. pentandra*) und *Salix* (*S. alba* und *S. fragilis*). Alle weiteren untersuchten Arten gehören dem Subgenus *Vetrix* (Skvortsov und Zinovjev, 1999) an. In **Abb. 6-18** sind alle Individuen der Sektion *Vetrix* (*S. cinerea*, *S. caprea*, *S. caprea* x *cinerea*) herausgegriffen. **Abb. 6-19** demonstriert die Weiden der Sektionen *Vimen* (*S. dasyclados*), *Canae* (*S. elaeagnos*) und *Incubaceae* (*S. repens*). Abschließend sind die Ergebnisse dieser Betrachtung bzgl. der Sektionen *Daphnella* (*S. daphnoides*) und *Helix* (*S. purpurea*) in **Abb. 6-20** aufgeführt.

Eine generelle Beobachtung für den gesamten Probensatz waren die absteigenden Konzentrationen innerhalb der oligomeren PA-Cluster (DP 2 – DP 10) in beiden untersuchten Geweben (DP 2 > DP 3 > DP 4 > usw.). Dieser Trend setzte sich allerdings nicht in der polymeren Fraktion fort. Damit scheint dieser Cluster weit mehr spezifisch für eine Spezies oder sogar für ein Gewebe zu sein, wie es sich bei der Betrachtung der *S. alba* und *S. fragilis* herauskristallisierte. Generell differenzieren sich die Vertreter des Subgenus *Salix*

(*S. pentandra*, *S. alba*, *S. fragilis*) durch eine höhere Gewichtung der polymeren PAs. Ungeachtet ihrer doch recht unterschiedlichen PA-Gehalte, zeigten diese, besonders in ihren Trieben, einen recht konstanten und vergleichsweise niedrigen Anteil oligomerer PAs über die gesamte Wachstumsperiode: *S. pentandra* (Triebe: $74\% \pm 7\%$; Blätter: $46\% \pm 11\%$), *S. alba* (Triebe: $58\% \pm 6\%$; Blätter: $63\% \pm 5\%$), *S. fragilis* (Triebe: $72\% \pm 5\%$; Blätter: $60\% \pm 7\%$). Damit schien diese Gruppe die Polymerfraktion zu bevorzugen. Darüber hinaus gestaltete sich die Gewichtung der oligomerer PAs zu den Gesamt-PAs der *S. alba*, *S. fragilis* und der Triebe der *S. pentandra* im Jahresverlauf recht ähnlich, während die Blätter der *S. pentandra* mit stetig ansteigendem Anteil oligomerer PAs eine Ausnahme bildeten (vgl. **Abb. 6-16** aus Kapitel **6.2.2.5**).

Die Triebe des Hybrids *S. caprea* x *cinerea* zeigten niedrige Gehalte oligomerer PAs, wie *S. cinerea*. Jedoch waren die polymeren PAs niedriger konzentriert, was eher dem Muster der beiden *S. caprea* Individuen entsprach. Diese Eigenschaft hatte allerdings auch einen reduzierten Gesamtgehalt an PAs in den Trieben dieser Weide zur Folge. Was die Entwicklung des oligomerer Anteils während des Beobachtungszeitraums in den Blättern des Hybrids angeht, zeigte dieser wie *S. cinerea* einen kontinuierlichen Anstieg von Frühling bis zum Spätsommer (vgl. **Abb. 6-16** aus Kapitel **6.2.2.5**). Zwischen den beiden Geschlechtern der *S. caprea* (**Abb. 6-18**) und *S. daphnoides* (**Abb. 6-20**) konnten keine nennenswerten Unterschiede ausgemacht werden. Im Falle der *S. caprea* zeigten beide Geschlechter die gleiche Akkumulationsstrategie mit Konzentrationsspitzen in den Blättern im Juli und in den Trieben im August. Die Fraktion der polymeren PAs war in beiden nur gering ausgeprägt. Jedoch zeigte sich für die polymeren PA-Gehalte in den Blättern ein steigender und in den Trieben ein fallender Trend (**Abb. 6-18**).

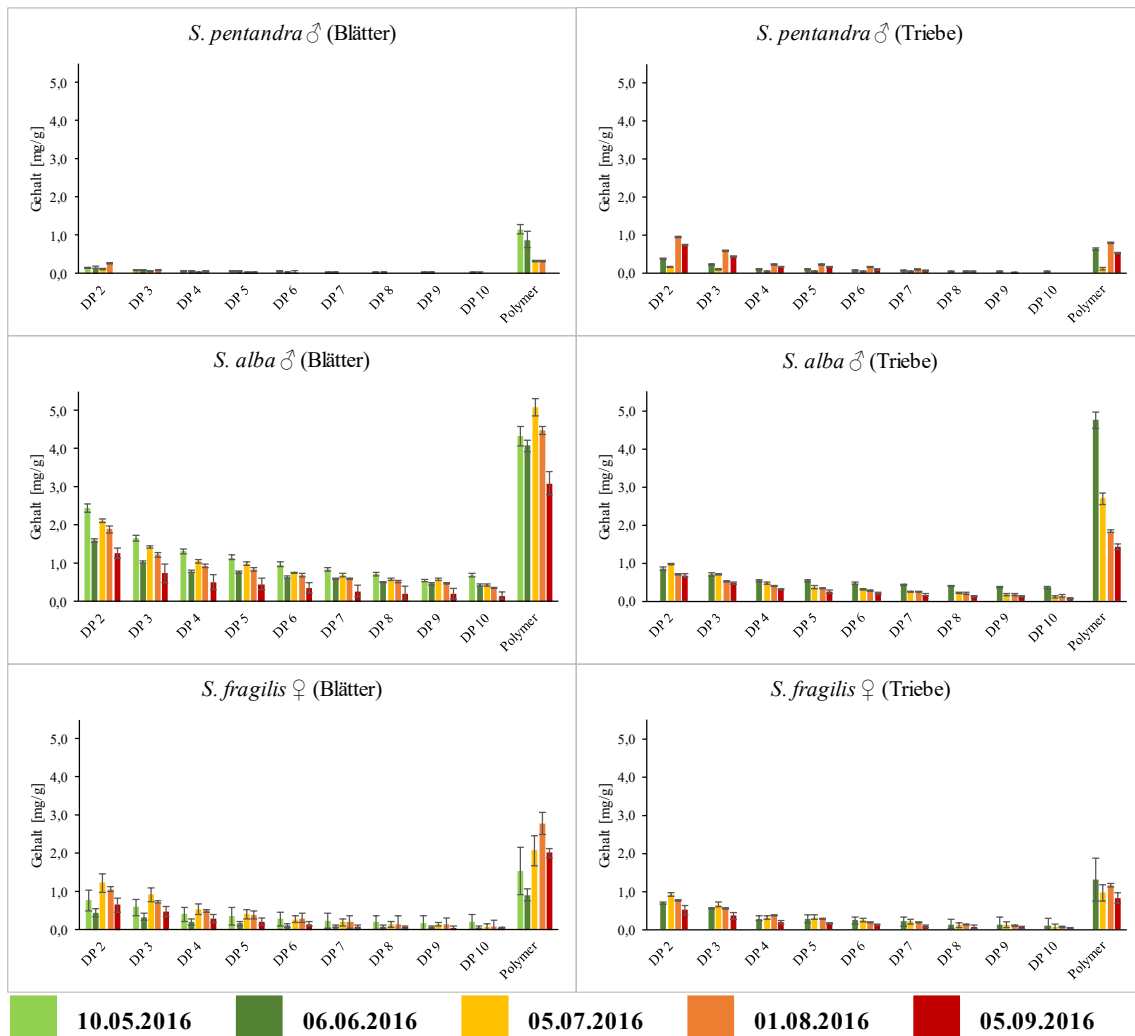


Abb. 6-17: Überblick zu den Jahresverläufen aller detektierten DPs bei den Vertretern des Subgenus *Salix*. Die zugrundeliegenden Daten wurden mit einer UPLC[®] DIOL Methode (Hellenbrand et al., 2015b; Kapitel 6.5.5) erhoben. Die Angabe erfolgt in mg PAs je g Drogenmaterial \pm SD (n = 3), berechnet als Catechin.

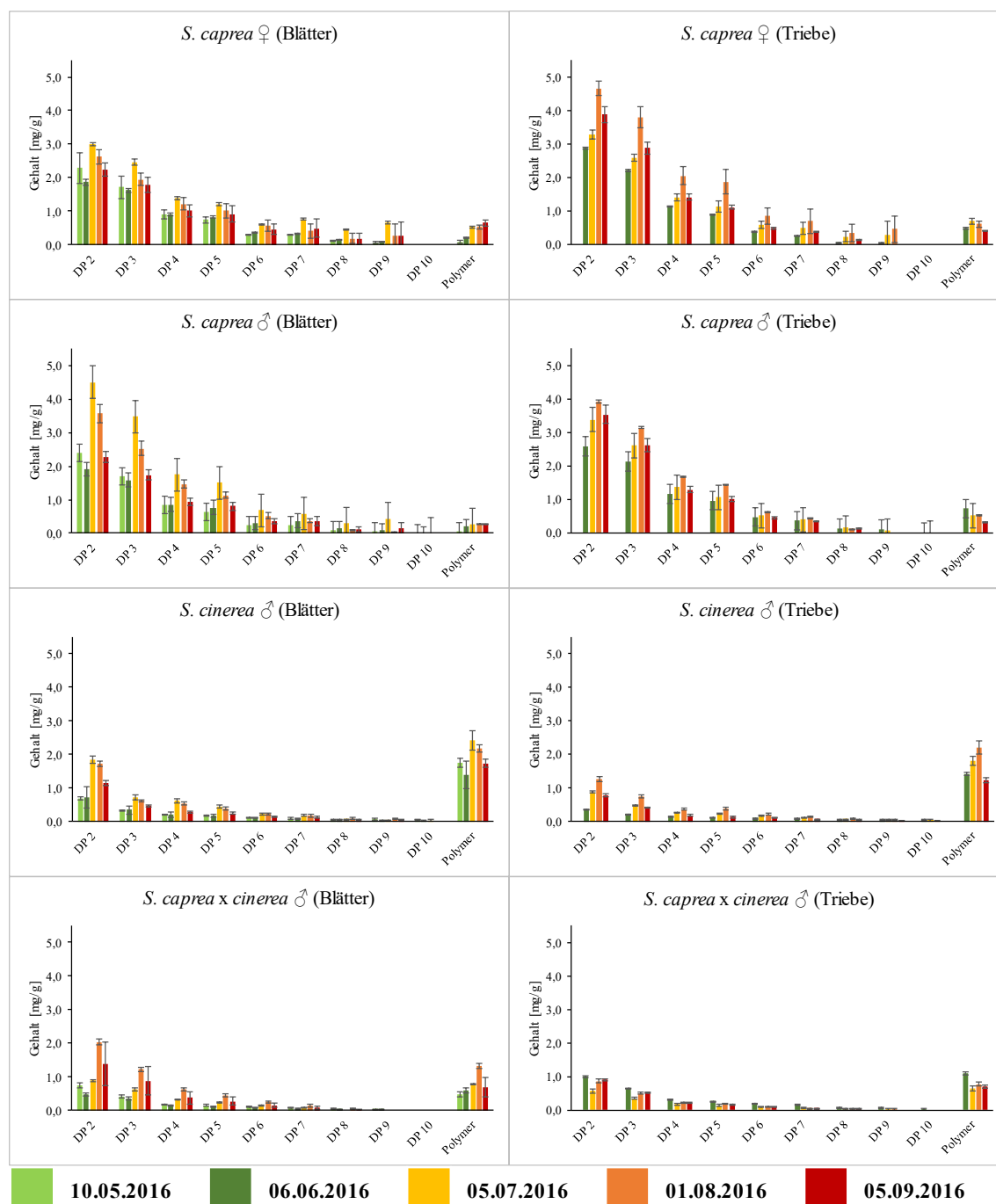


Abb. 6-18: Überblick zu den Jahresverläufen aller detektierten DPs bei den Vertretern des Subgenus *Vetrix* und Sektion *Vetrix*. Die zugrundeliegenden Daten wurden mit einer UPLC[®] DIOL Methode (Hellenbrand et al., 2015b; Kapitel 6.5.5) erhoben. Die Angabe erfolgt in mg PAs je g Drogenmaterial \pm SD (n = 3), berechnet als Catechin.

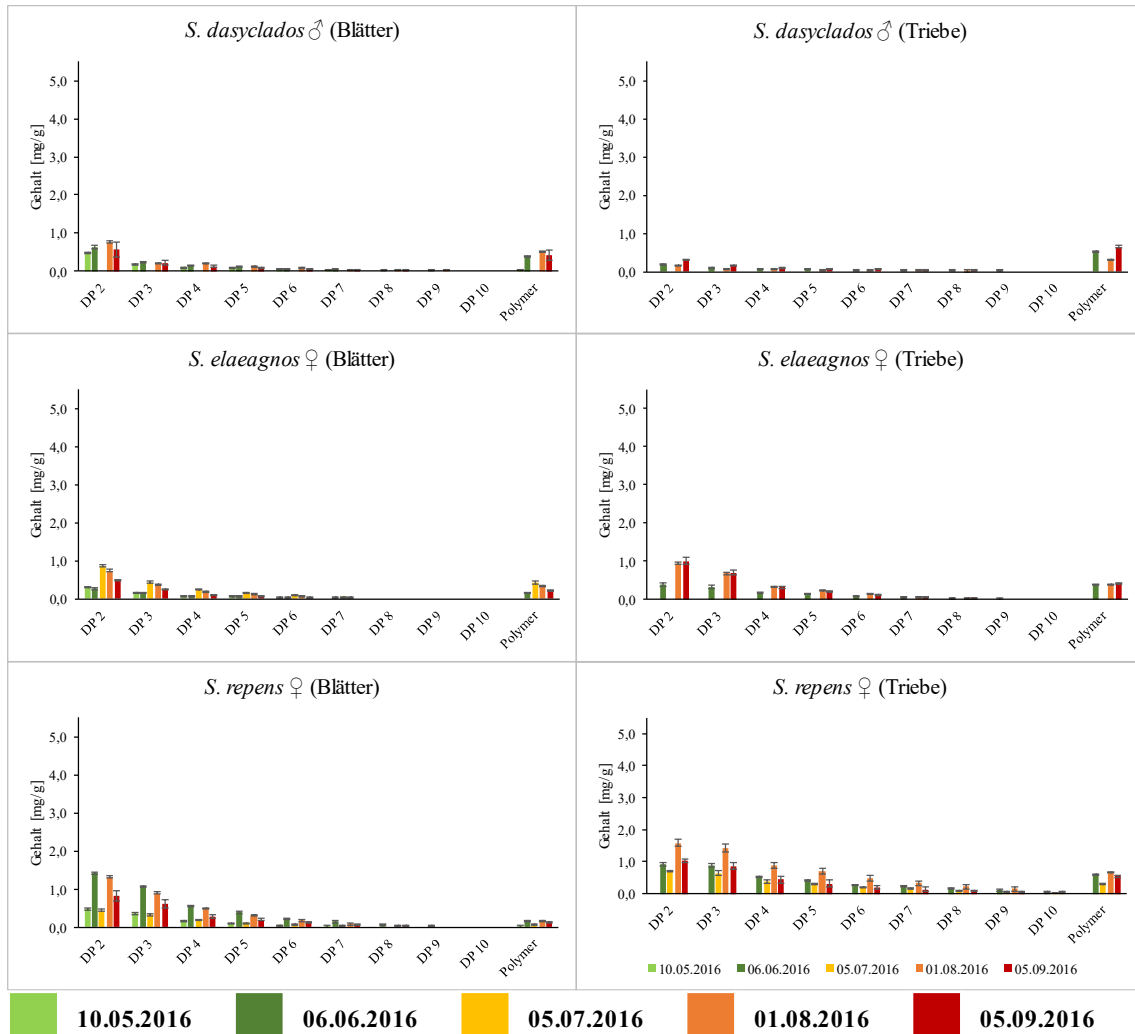


Abb. 6-19: Überblick zu den Jahresverläufen aller detektierten DPs bei den Vertretern des Subgenus *Vetrix* und Sektionen *Vimen* (*S. dasyclados*), *Canae* (*S. elaeagnos*) und *Incubaceae* (*S. repens*). Die zugrundeliegenden Daten wurden mit einer UPLC[®] DIOL Methode (Hellenbrand et al., 2015b; Kapitel 6.5.5) erhoben. Die Angabe erfolgt in mg PAs je g Drogenmaterial \pm SD (n = 3), berechnet als Catechin.

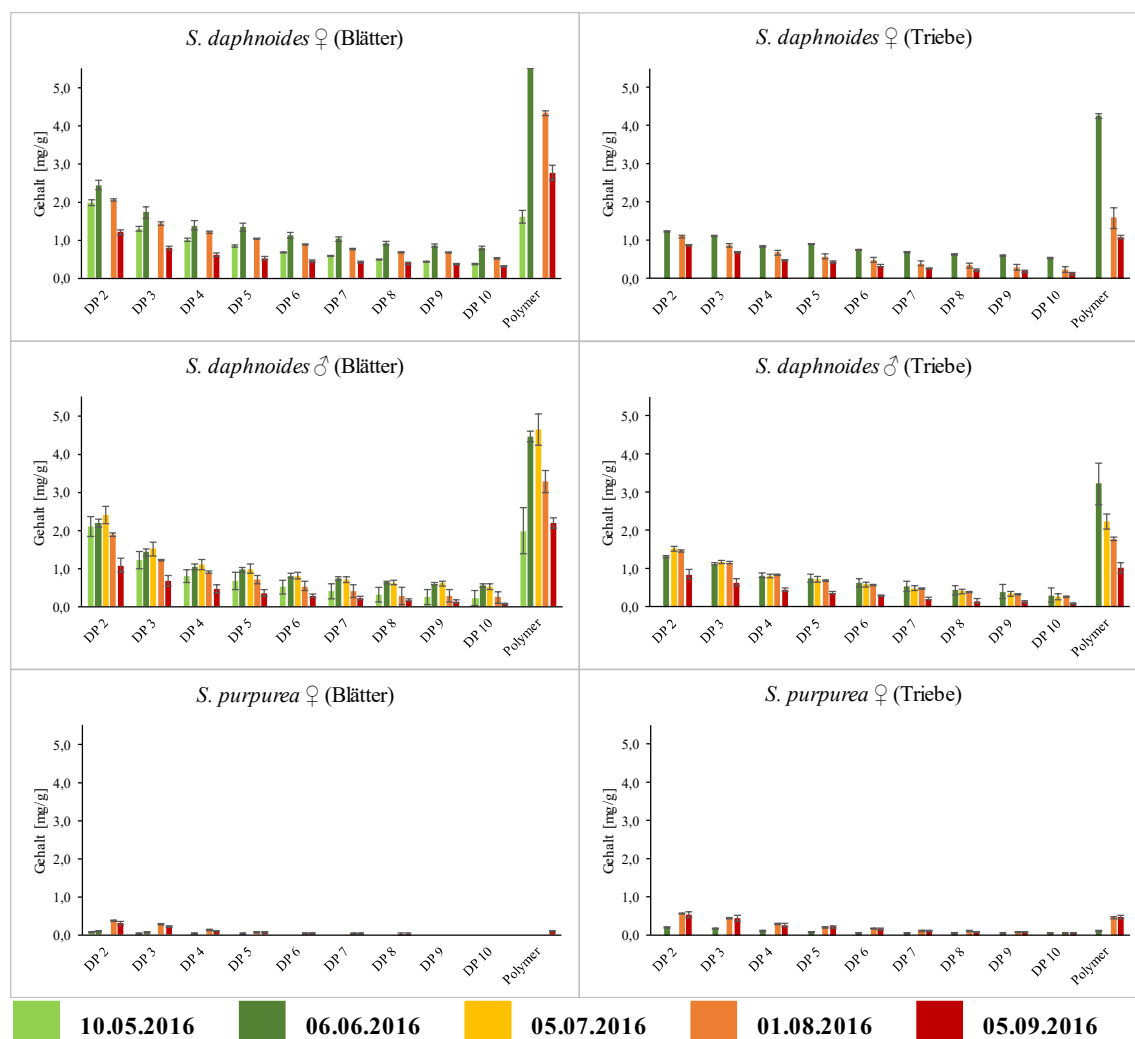


Abb. 6-20: Überblick zu den Jahresverläufen aller detektierten DPs bei den Vertretern des Subgenus *Vetrix* und Sektionen *Daphnella* (*S. daphnoides*) und *Helix* (*S. purpurea*). Die zugrundeliegenden Daten wurden mit einer UPLC[®] DIOL Methode (Hellenbrand et al., 2015b; Kapitel 6.5.5) erhoben. Die Angabe erfolgt in mg PAs je g Drogenmaterial \pm SD (n = 3), berechnet als Catechin.

6.2.3 Vergleichende Bewertung der Salicylalkoholderivate

Für diese Betrachtung wurden alle Verbindungen, die ein UV-Maximum zwischen 264 – 274 nm zeigten, zusammengefasst und deren Gehalt als Salicin berechnet (vgl. Kapitel 6.5.6 und Beispielchromatogramm mit UV-Spektrum in Abb. 6-56 aus demselben Kapitel). In **Tabelle 6-3** sind die maximalen und minimalen detektierten Konzentrationen dieser Substanzklasse während des Probenzeitraums mit ihren korrespondierenden Monaten aufgeführt. Betrachtet man die Akkumulation in den Monaten mit den niedrigsten Werten, zeigt sich in Blättern und Trieben ein recht ähnliches Bild. So wurden die minimalen Gehalte in den Blättern bei nahezu allen Weiden im Mai oder Juni gefunden, während in den Trieben im letzteren Monat die niedrigsten Konzentrationen zu finden waren. Meist wurden die maximalen Gehalte in Blättern im September und in den diesjährigen Trieben im August registriert.

In **Abb. 6-21** sind die maximalen Gehalte in Blättern und Trieben gegeneinander aufgetragen. Dabei stachen *S. elaeagnos* und *S. repens* heraus, da beide hohe Konzentrationen an Salicylalkoholderivaten in beiden Geweben, jedoch mit Präferenz für die Triebe, zeigten. Besonders gleichverteilt zwischen den beiden untersuchten Organen waren die Werte bei *S. caprea* x *cinerea* und *S. fragilis*. Bei *S. purpurea* fiel der hohe Gehalt dieser Strukturklasse in den Blättern

Tabelle 6-3: Maximale und minimale Salicylalkohol-Gehalte in den untersuchten *Salix* Spezies. Die Daten wurden mit einer RP-18 UPLC® Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Um die Gesamtgehalte zu ermitteln, wurden die Konzentrationen aller Peaks aufsummiert. Die Ergebnisse sind als µmol Salicylalkohole je g Droge, berechnet als Salicin aufgeführt.

		<i>S. pentandra</i> ♂	<i>S. alba</i> ♂	<i>S. fragilis</i> ♀	<i>S. caprea</i> ♀	<i>S. caprea</i> ♂	<i>S. caprea</i> x <i>cinerea</i> ♂	<i>S. cinerea</i> ♂	<i>S. dasyclados</i> ♂	<i>S. elaeagnos</i> ♀	<i>S. daphnoides</i> ♀	<i>S. daphnoides</i> ♂	<i>S. repens</i> ♀	<i>S. purpurea</i> ♀
Blätter	max Gehalt [µmol/g]	169,7	31,0	190,2	4,7	4,3	77,6	184,7	78,3	334,0	14,4	17,1	428,7	649,3
	max Monat	Mai	Sept.	Sept.	Sept.	Sept.	Sept.	Aug.	Sept.	Sept.	Mai	Mai	Juni	Juni
	min Gehalt [µmol/g]	0,0	0,0	91,9	0,0	0,0	0,0	28,1	14,1	187,4	0,0	0,0	45,1	288,9
	min Monat	Aug.	Mai	Aug.	Mai	Mai	Mai	Mai	Juni	Juni	Juni	Juni	Juli	Sept.
Triebe	max Gehalt [µmol/g]	410,8	148,3	214,2	211,9	376,2	82,9	439,2	323,2	792,2	341,6	491,1	733,7	395,0
	max Monat	Aug.	Sept.	Juli	Aug.	Aug.	Sept.	Aug.	Sept.	Aug.	Aug.	Aug.	Aug.	Sept.
	min Gehalt [µmol/g]	90,4	72,6	195,9	88,8	92,9	41,5	65,9	0,0	454,3	268,7	266,3	478,2	246,2
	min Monat	Juli	Juni	Sept.	Juni	Juni	Juli	Juni	Juni	Juni	Juni	Sept.	Juni	Juni

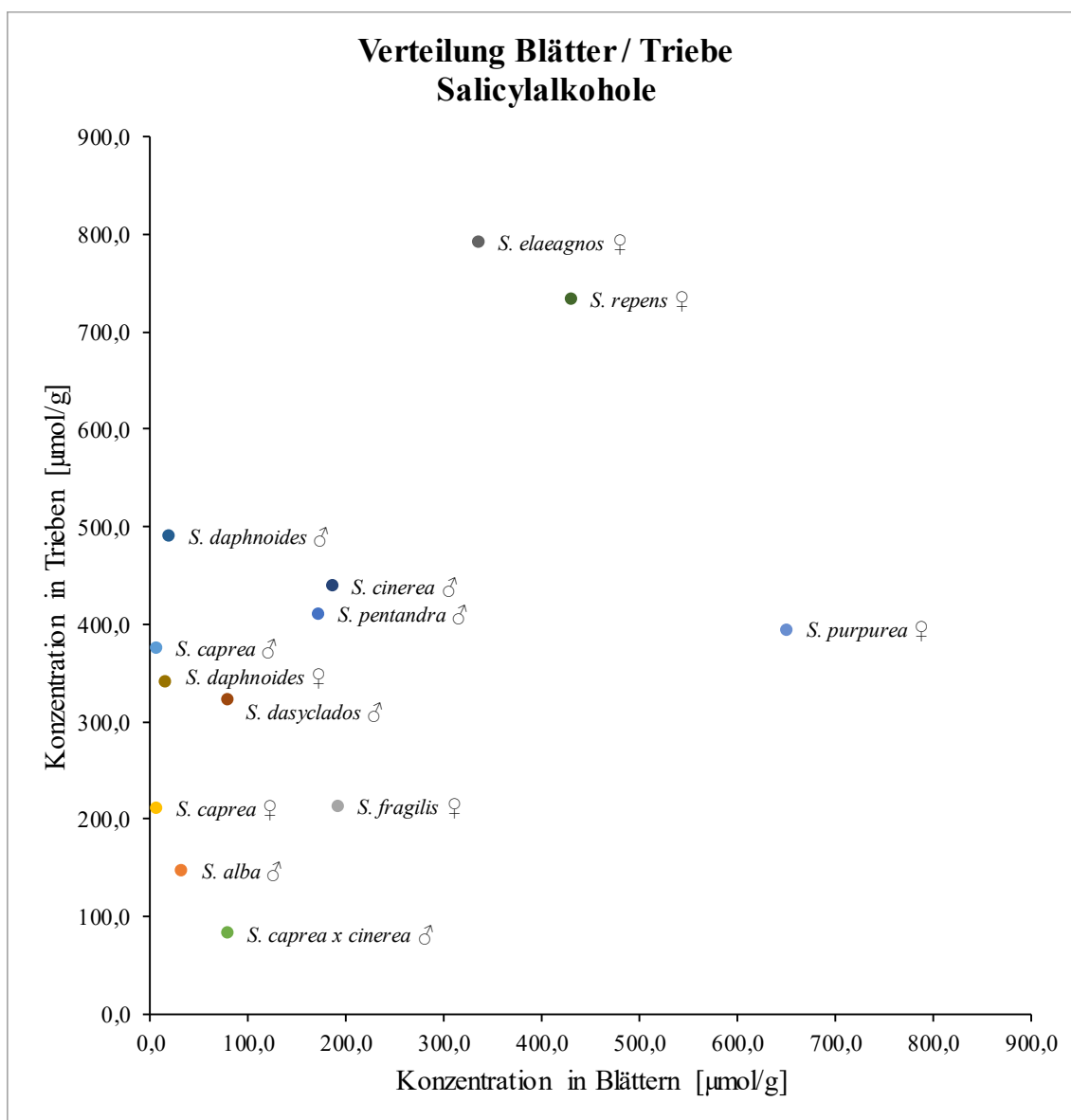


Abb. 6-21: Graphische Darstellung der Verteilung der Salicylalkoholderivate zwischen den Blättern und Trieben. In dieser Darstellung wurden die maximalen Werte für jede Probe berücksichtigt, die während der Wachstumsperiode erreicht wurden. Die Konzentrationen sind in µmol Salicylalkoholderivate je g Droge, berechnet als Salicin angegeben.

auf. Alle anderen Weiden zeichneten sich, diese Strukturklasse betreffend, mit einer Präferenz für die Triebe aus. Beim Vergleich der Geschlechter der beiden *S. caprea* und *S. daphnoides* Individuen konnte festgestellt werden, dass in beiden Beispielen in den ♂♂ mehr Salicylalkohole in den Trieben detektiert wurden als in den ♀♀. In den Blättern konnten in beiden Arten keine nennenswerten Gehalte gefunden werden. Der Hybrid *S. caprea* x *cinerea* zeigte im Vergleich zu allen anderen Proben die niedrigsten Werte in den Trieben. In den Blättern bewegte sich der maximale Gehalt zwischen denen der *S. caprea* und *S. cinerea*.

In **Abb. 6-22 - 6-25** sind die Jahresverläufe der Salicylalkoholderivate aufgeführt. Dabei wurden zum einen die Gesamtgehalte aufgetragen und in der jeweils zweiten Abbildung die Anzahl an berücksichtigten Peaks, die dieser Klasse zugeordnet wurden. Wie sich bereits durch die Ergebnisse aus **Tabelle 6-3** andeutete, stellte sich auch hier bei allen Weiden heraus, dass die Salicylalkohole über den gesamten Jahresverlauf hinweg in den Trieben stärker konzentriert sind. Die einzige Ausnahme bildete dabei *S. purpurea* (**Abb. 6-25**), die die höheren Gehalte in ihren Blättern zeigte. Erst im September kehrte sich hier das Verhältnis zugunsten der Triebe um. Vergleicht man die Konzentrationen mit der jeweiligen Anzahl an Verbindungen in einer Probe, scheinen beide Eigenschaften miteinander direkt proportional zu sein. Das bedeutet, dass im Falle eines größeren Gehalts auch mehr Verbindungen dieser Stoffklasse detektiert wurden. Interessant dabei waren jedoch die Werte der *S. cinerea* (**Abb. 6-23**) und *S. repens* (**Abb. 6-24**) im September. In diesem Monat zeigten beide Spezies zwar die größeren Konzentrationen in den Trieben, allerdings scheint die Strukturvielfalt in den Blättern geringfügig größer zu sein. Zwischen den Geschlechtern sind weder bei *S. caprea* (**Abb. 6-23**), noch bei *S. daphnoides* (**Abb. 6-25**) merkliche Unterschiede erkennbar. Vergleicht man den Bastard *S. caprea* x *cinerea* (**Abb. 6-23**) mit seinen Eltern, kann eine größere Ähnlichkeit mit *S. cinerea* vermutet werden, da in beiden Fällen auch in den Blättern höhere Konzentrationen gefunden werden konnten als in beiden Geschlechtern der *S. caprea*.

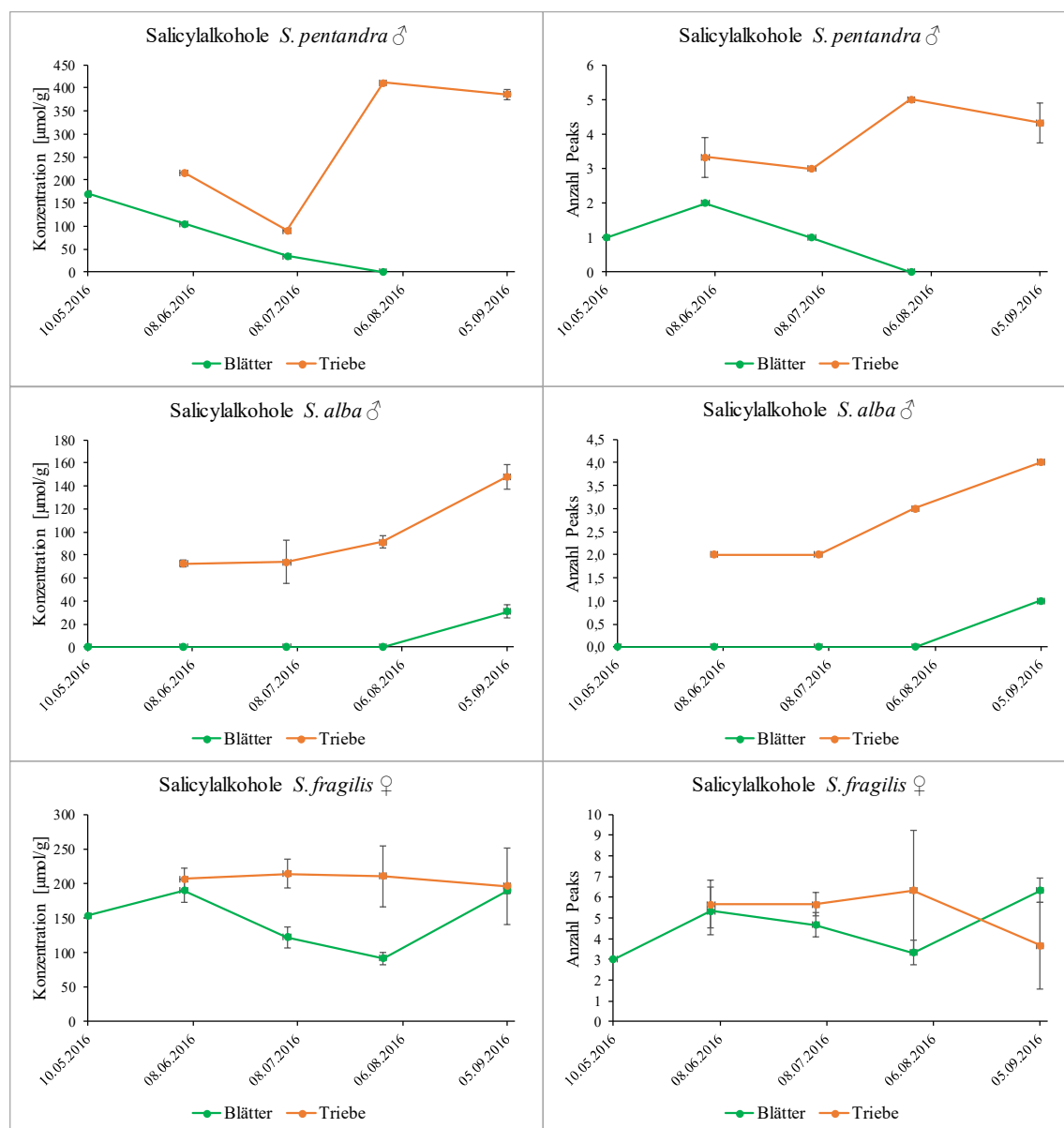


Abb. 6-22: Übersicht zum Jahresverlauf der Salicylalkoholderivate bei den Vertretern des Subgenus *Salix*. Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC[®] RP-18 Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Auf der linken Seite sind die Konzentrationsverläufe in μmol Analyt je g Drogenmaterial \pm SD ($n = 3$), berechnet als Salicin aufgeführt. Die rechte Seite zeigt die Anzahl \pm SD ($n = 3$) berücksichtigten Peaks in den Proben.

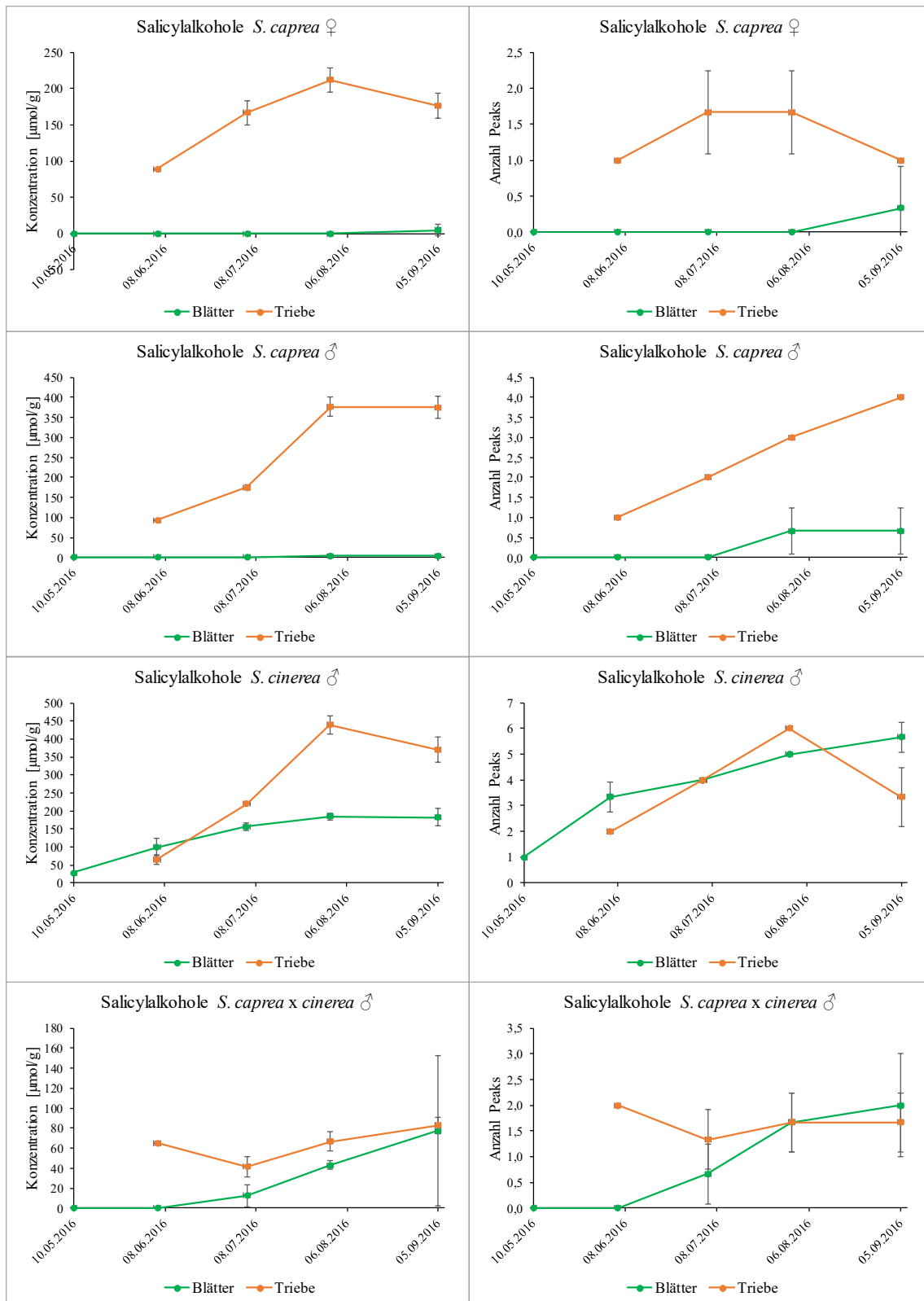


Abb. 6-23: Übersicht zum Jahresverlauf der Salicylalkoholderivate bei den Vertretern des Subgenus *Vetrix* und Sektion *Vetrix*. Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC[®] RP-18 Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Auf der linken Seite sind die Konzentrationsverläufe in µmol Analyt je g Drogenmaterial ± SD (n = 3), berechnet als Salicin aufgeführt. Die rechte Seite zeigt die Anzahl ± SD (n = 3) berücksichtigter Peaks in den Proben.

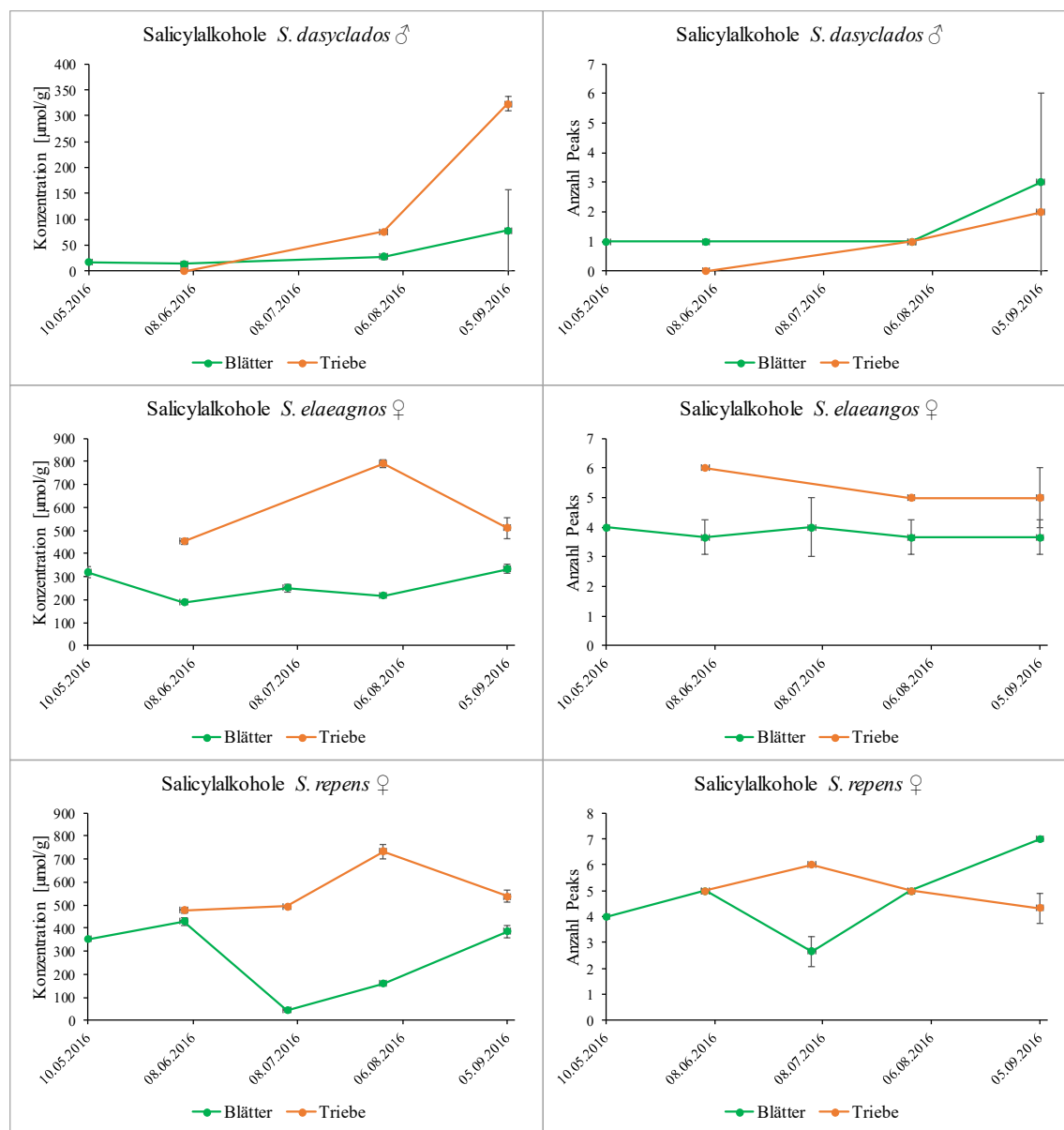


Abb. 6-24: Übersicht zum Jahresverlauf der Salicylalkoholderivate bei den Vertretern des Subgenus *Vetrix* und Sektionen *Vimen* (*S. dasyclados*), *Canae* (*S. elaeagnos*) und *Incubaceae* (*S. repens*). Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC[®] RP-18 Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Auf der linken Seite sind die Konzentrationsverläufe in μmol Analyt je g Drogenmaterial \pm SD ($n = 3$), berechnet als Salicin aufgeführt. Die rechte Seite zeigt die Anzahl \pm SD ($n = 3$) berücksichtigter Peaks in den Proben.

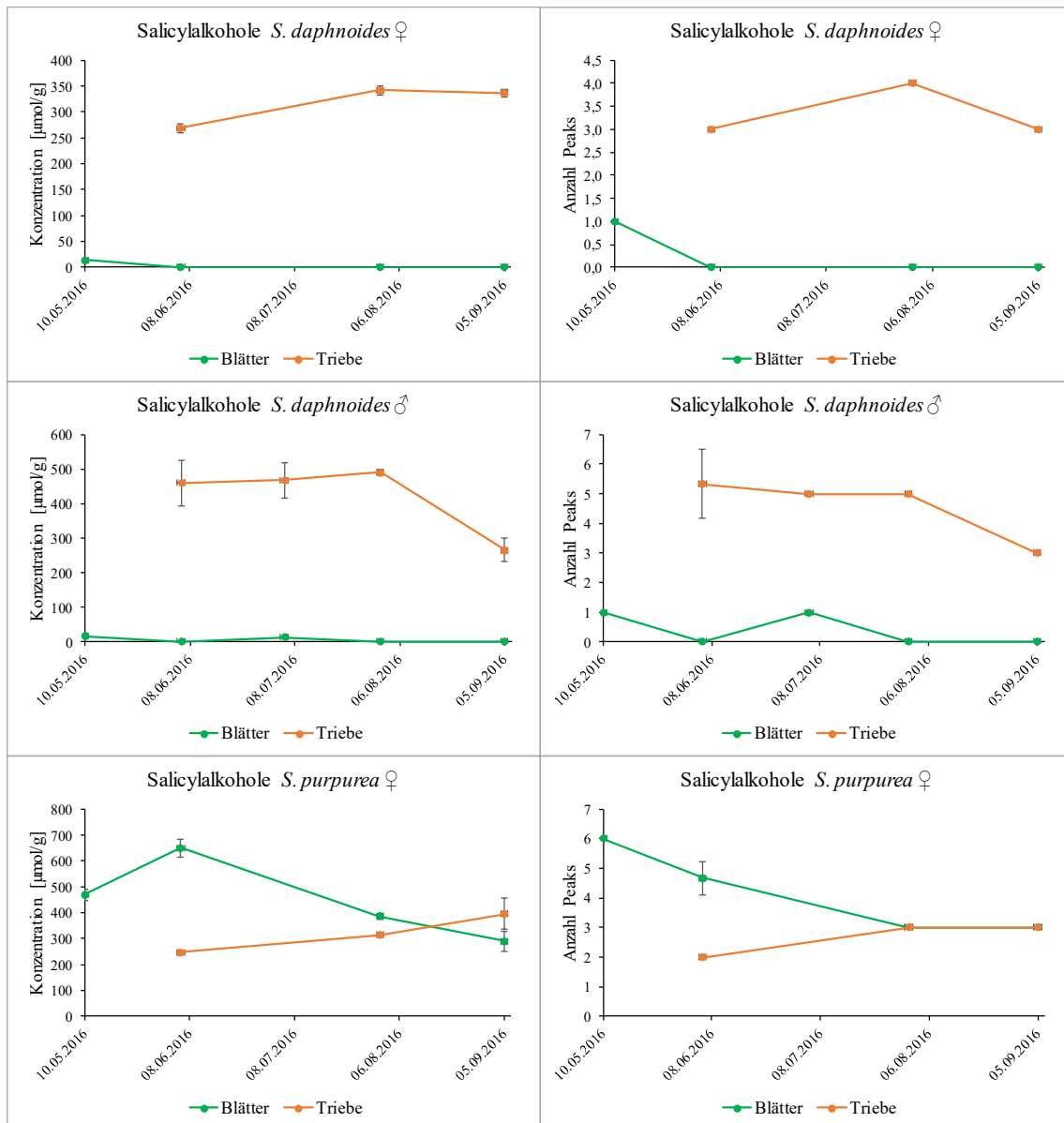


Abb. 6-25: Übersicht zum Jahresverlauf der Salicylsäurederivate bei den Vertretern des Subgenus *Vetrix* und Sektionen *Daphnella* (*S. daphnoides*) und *Helix* (*S. purpurea*). Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC® RP-18 Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Auf der linken Seite sind die Konzentrationsverläufe in μmol Analyt je g Drogenmaterial \pm SD ($n = 3$), berechnet als Salicin aufgeführt. Die rechte Seite zeigt die Anzahl \pm SD ($n = 3$) berücksichtigter Peaks in den Proben.

6.2.4 Vergleichende Bewertung der Phenylpropansäuren

Alle Verbindungen, welche UV-Maxima zwischen 305 – 330 nm aufwiesen, wurden als Phenylpropansäuren definiert (vgl. Kapitel 6.5.6 und Beispielchromatogramm mit UV-Spektrum in Abb. 6-56 aus demselben Kapitel). Substanzen, die zu dieser Stoffgruppe gehören sind Cumarsäure, Kaffeesäure oder deren Ester, wie z.B. Chlorogensäure. In **Tabelle 6-4** sind die minimalen und maximalen Konzentrationen dieser Inhaltsstoffgruppe mit ihren korrespondierenden Monaten gezeigt. Dabei konnte festgestellt werden, dass in den Blättern die höchsten Gehalte meist im Mai und die niedrigsten im September detektiert werden. In den Trieben werden die höchsten Werte bei nahezu allen Weiden im August oder September festgestellt. Dagegen scheinen die Minimalwerte nicht in einem bestimmten Monat aufzutreten.

In **Abb. 6-26** ist die Distribution dieser Stoffgruppe innerhalb der beiden untersuchten Pflanzenorgane gegenübergestellt. Dabei zeigen *S. pentandra*, *S. alba* und *S. fragilis* die größten Werte innerhalb dieses Probensatzes in den Blättern. Die beiden Letzteren weisen zusätzlich auch die größten Konzentrationen von allen untersuchten Weiden in den Trieben auf. *S. repens* und *S. dasyclados* sind die einzigen Vertreter dieses Genus mit ausgewogenen Gehalten zwischen Blättern und Trieben. Eine weitere Sonderstellung haben die beiden Individuen der

Tabelle 6-4: Maximalen und minimale Phenylpropansäure-Gehalte in den untersuchten *Salix* Spezies. Die Daten wurden mit einer RP-18 UPLC® Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Um die Gesamtgehalte zu ermitteln, wurden die Konzentrationen aller Peaks aufsummiert. Die Ergebnisse sind als µmol Phenylpropansäuren je g Droge, berechnet als Kaffeesäure aufgeführt.

		<i>S. pentandra</i> ♂	<i>S. alba</i> ♂	<i>S. fragilis</i> ♀	<i>S. caprea</i> ♀	<i>S. caprea</i> ♂	<i>S. caprea x cinerea</i> ♂	<i>S. cinerea</i> ♂	<i>S. dasyclados</i> ♂	<i>S. elaeagnos</i> ♀	<i>S. daphnoides</i> ♀	<i>S. daphnoides</i> ♂	<i>S. repens</i> ♀	<i>S. purpurea</i> ♀
Blätter	max Gehalt [µmol/g]	77,9	80,7	123,3	16,3	22,8	14,5	20,8	37,0	6,3	4,3	9,7	21,6	16,5
	max Monat	Juni	Mai	Juli	Mai	Mai	Mai	Mai	Juni	Mai	Aug.	Sept.	Juni	Aug.
	min Gehalt [µmol/g]	30,0	45,5	59,7	2,7	5,3	1,9	11,7	13,4	0,6	0,7	2,0	10,4	6,8
	min Monat	Juli	Sept.	Sept.	Sept.	Sept.	Sept.	Juni	Sept.	Sept.	Mai	Juni	Sept.	Mai
Triebe	max Gehalt [µmol/g]	4,1	26,9	26,8	4,9	2,0	1,3	6,3	23,4	0,1	15,0	12,8	21,5	3,6
	max Monat	Aug.	Juni	Juni	Sept.	Sept.	Sept.	Aug.	Juni	Aug.	Sept.	Aug.	Aug.	Sept.
	min Gehalt [µmol/g]	0,5	11,5	6,3	2,0	1,0	0,5	3,3	4,3	0,0	12,8	10,5	12,9	0,2
	min Monat	Juli	Sept.	Sept.	Juni	Juni	Juli	Sept.	Sept.	Juni	Aug.	Sept.	Juli	Juni

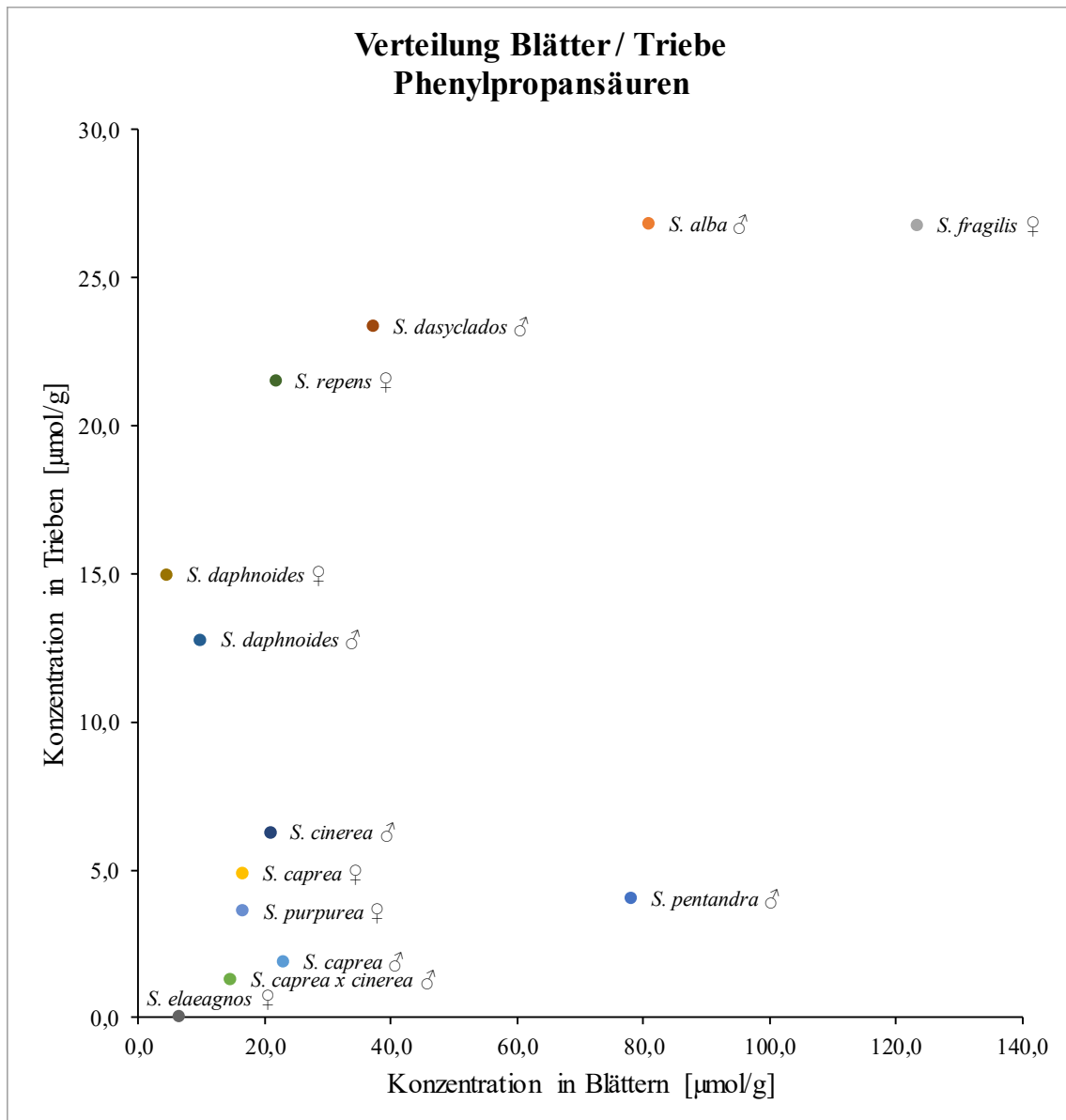


Abb. 6-26: Graphische Darstellung der Verteilung der Phenylpropansäuren zwischen den Blättern und Trieben. In dieser Darstellung wurden die maximalen Werte für jede Probe berücksichtigt, die während der Wachstumsaison erreicht wurden. Die Konzentrationen sind in µmol Phenylpropansäuren je g Droge, berechnet als Kaffeesäure angegeben.

S. daphnoides, da diese die einzigen Vertreter darstellen, bei denen höheren Konzentrationen an Phenylpropansäuren in den Trieben zu finden sind. Alle verbliebenen Weiden zeigten in beiden Geweben deutlich niedrigere Werte als die bisher erwähnten. Jedoch wiesen alle eine gewisse Präferenz für die Blätter als Anreicherungsart auf.

In **Abb. 6-27 - 6-30** sind die Jahresverläufe der Phenylpropansäuren gezeigt. Dabei wurden zum einen der Konzentrationsverlauf und zum anderen die Anzahl an unterschiedlichen Verbindungen dieser Stoffklasse untersucht. Die Vertreter des Subgenus *Salix* (**Abb. 6-27**) haben hohe Konzentrationen an Phenylpropansäuren in den Blättern gemeinsam. Keine weitere untersuchte Spezies konnte diese Werte erreichen. Innerhalb der Sektion *Vetrix* (**Abb. 6-28**) konnten keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Individuen gefunden werden. Dies schloss auch Unterschiede zwischen den Geschlechtern (*S. caprea*) ein, was sich auch im Falle der *S. daphnoides* Individuen (**Abb. 6-30**) ähnlich darstellte. Bei *S. caprea* ♀ (**Abb. 6-28**) und *S. repens* (**Abb. 6-29**) konnte ein Wechsel des Akkumulierungsortes zu Gunsten der Triebe im letzten Monat des Untersuchungszeitraums registriert werden. Die Verläufe der Anzahl detektierter Peaks sind auch in Bezug auf die Phenylpropansäuren mit den gemessenen Gesamtgehalten korreliert.

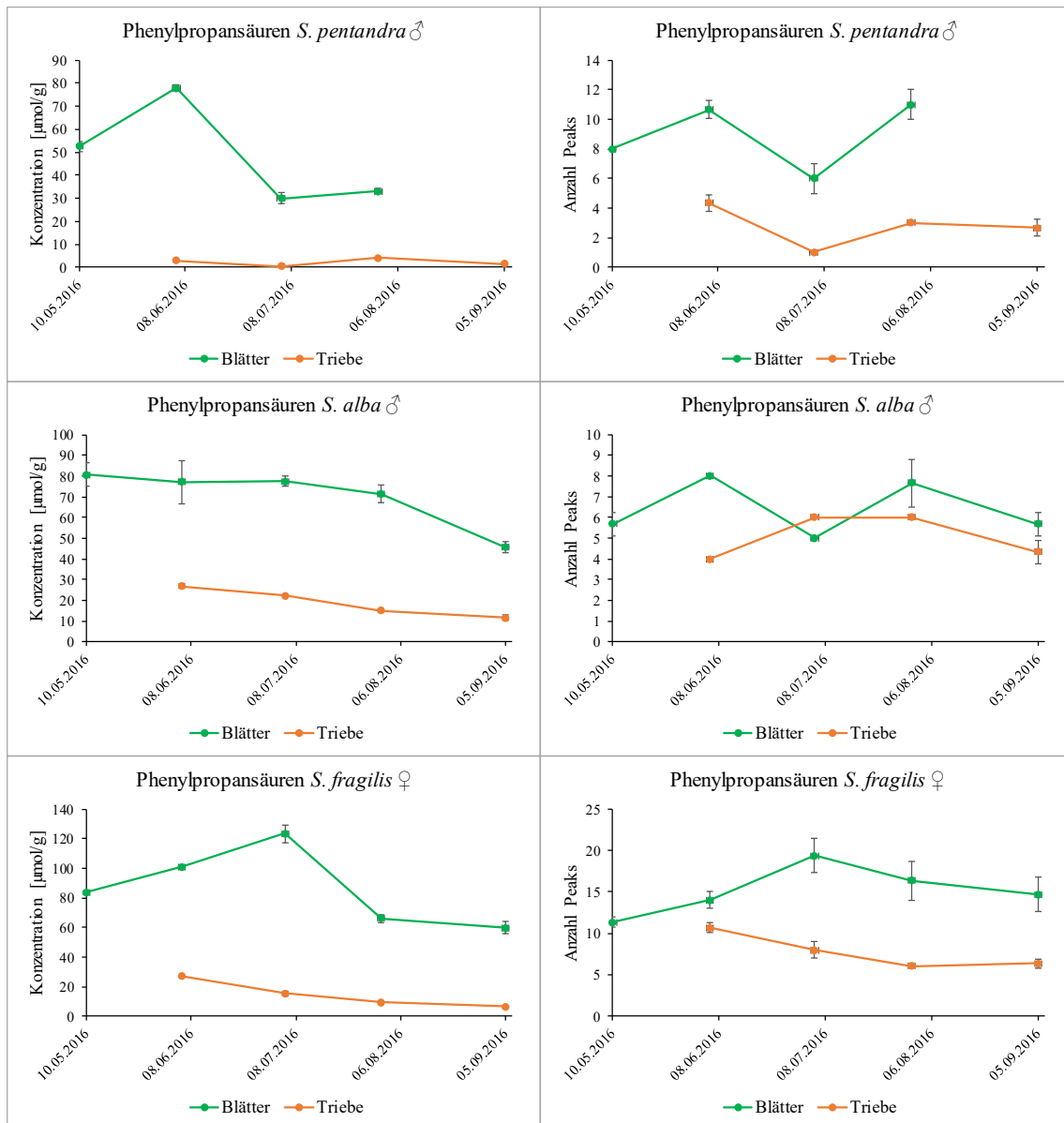


Abb. 6-27: Übersicht zum Jahresverlauf der Phenylpropansäuren bei den Vertretern des Subgenus *Salix*. Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC[®] RP-18 Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Auf der linken Seite sind die Konzentrationsverläufe in µmol Analyt je g Drogenmaterial ± SD (n = 3), berechnet als Kaffeesäure aufgeführt. Die rechte Seite zeigt die Anzahl ± SD (n = 3) berücksichtigter Peaks in den Proben.

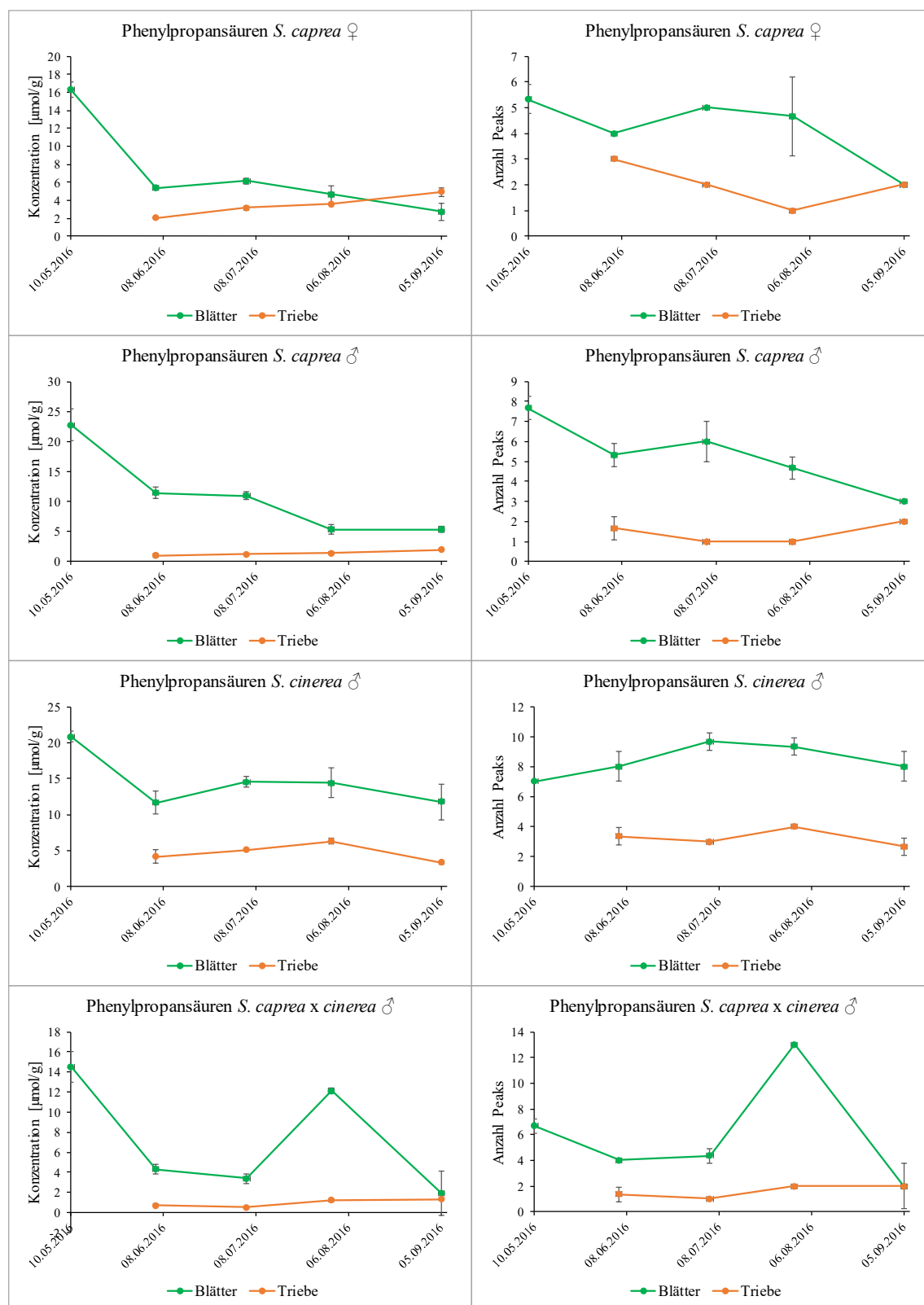


Abb. 6-28: Übersicht zum Jahresverlauf der Phenylpropansäuren bei den Vertretern des Subgenus *Vetrix* und Sektion *Vetrix*. Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC[®] RP-18 Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Auf der linken Seite sind die Konzentrationsverläufe in μmol Analyt je g Drogenmaterial \pm SD ($n = 3$), berechnet als Kaffeesäure aufgeführt. Die rechte Seite zeigt die Anzahl \pm SD ($n = 3$) berücksichtigter Peaks in den Proben.

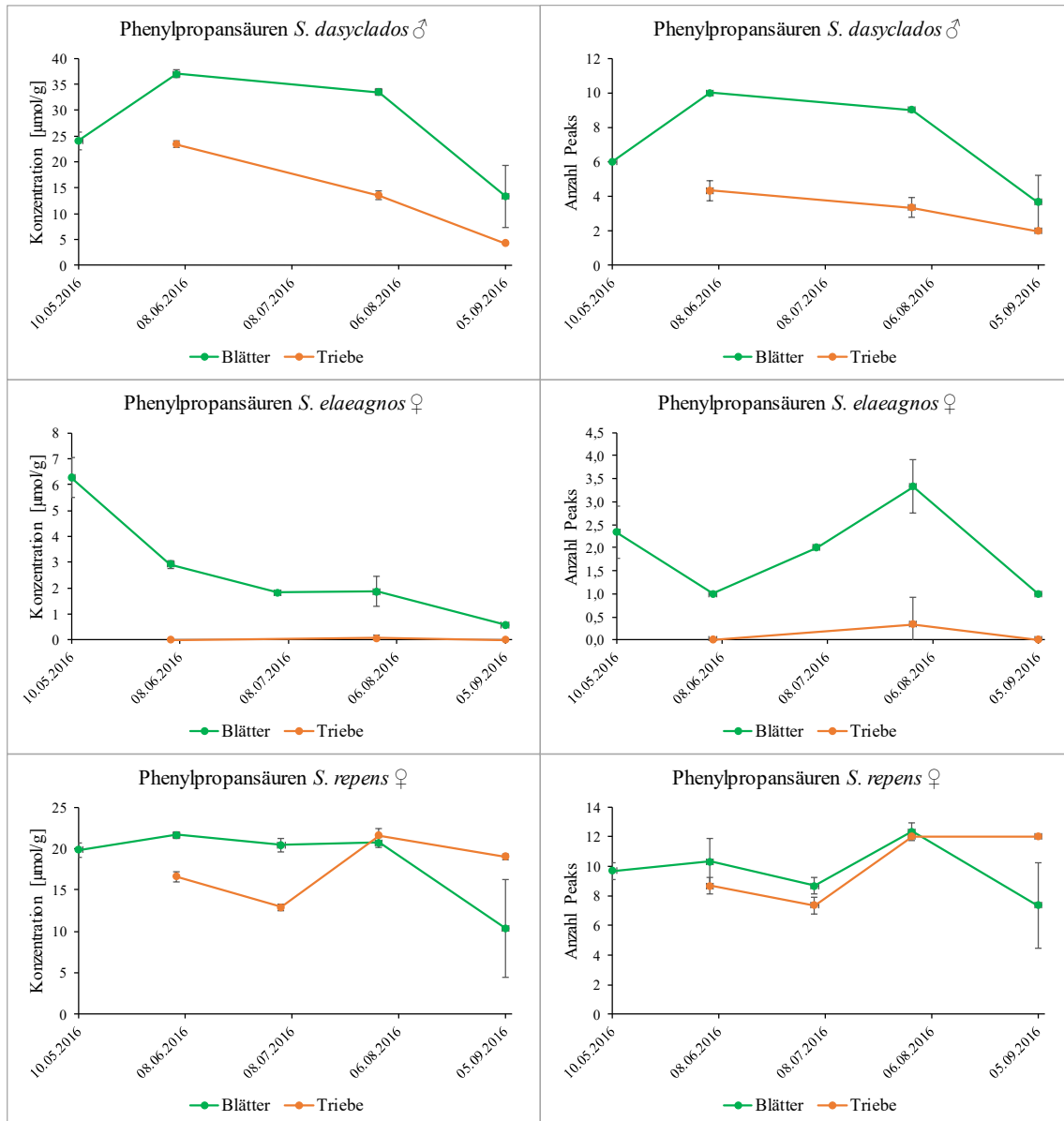


Abb. 6-29: Übersicht zum Jahresverlauf der Phenylpropansäuren bei den Vertretern des Subgenus *Vetrix* und Sektionen *Vimen* (*S. dasyclados*), *Canae* (*S. elaeagnos*) und *Incubaceae* (*S. repens*). Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC® RP-18 Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Auf der linken Seite sind die Konzentrationsverläufe in μmol Analyt je g Drogenmaterial \pm SD ($n = 3$), berechnet als Kaffeesäure aufgeführt. Die rechte Seite zeigt die Anzahl \pm SD ($n = 3$) berücksichtigter Peaks in den Proben.

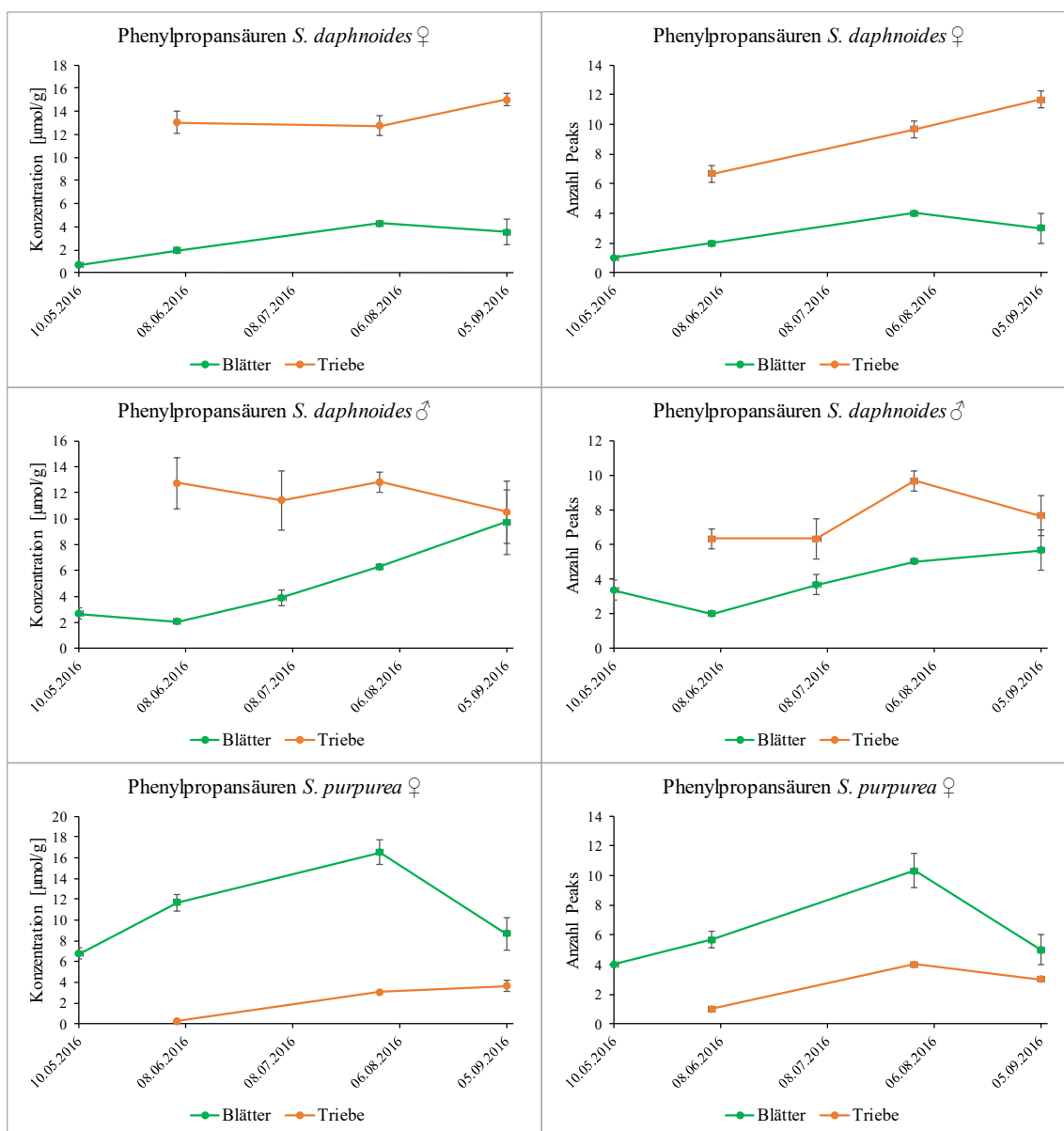


Abb. 6-30: Übersicht zum Jahresverlauf der Phenylpropansäuren bei den Vertretern des Subgenus *Vetrix* und Sektionen *Daphnella* (*S. daphnoides*) und *Helix* (*S. purpurea*). Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC® RP-18 Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Auf der linken Seite sind die Konzentrationsverläufe in µmol Analyt je g Drogenmaterial ± SD (n = 3), berechnet als Kaffeesäure aufgeführt. Die rechte Seite zeigt die Anzahl ± SD (n = 3) berücksichtigter Peaks in den Proben.

6.2.5 Vergleichende Bewertung der Flavanone

Hier wurden alle Verbindungen, die ein UV-Maximum zwischen 284 – 294 nm in ihren UV-Spektren zeigten der Klasse der Flavanone zugeordnet (vgl. Kapitel 6.5.6 und Beispielchromatogramm mit UV-Spektrum in Abb. 6-56 aus demselben Kapitel). Strukturbeispiele dazu sind z.B. das Naringenin, das Eriodictyol und deren Glykoside. In **Tabelle 6-5** sind die minimalen und maximalen Werte bzgl. der Flavanone und die korrespondierenden Monate aufgeführt. Durch diese Aufarbeitung der Daten konnte festgestellt werden, dass die minimalen Werte in den Blättern im Mai und in den Trieben im Juni zu finden sind. Beide genannten Monate stellten den jeweiligen Beginn der erhobenen Datenreihen für die jeweiligen Gewebe dar. In den Trieben ist eine Häufung der maximalen Konzentrationen im August zu erkennen. In den Blättern sind die Maximalwerte über den Beobachtungszeitraum recht gleich verteilt. Lediglich der Juli bildete eine Ausnahme, da hier bei keiner Weide ein maximaler Gehalt zu finden ist.

In **Abb. 6-31** sind die maximalen Konzentrationen in den Blättern und Trieben gegeneinander korreliert. Dabei fallen zunächst *S. fragilis* und *S. purpurea* auf. Beide weisen zweistellige Konzentrationen im $\mu\text{mol/g}$ -Bereich sowohl in den Blättern als auch in den Trieben auf. *S. fragilis* zeigt hier sehr ausgeglichene Gehalte an Flavanonen (Triebe: $11,5 \mu\text{mol/g}$; Blätter: $12,1 \mu\text{mol/g}$), wohingegen *S. purpurea* deutlich die Blätter ($98,7 \mu\text{mol/g}$) gegenüber den Trieben ($39,4 \mu\text{mol/g}$) bevorzugt. Diese Spezies weist damit auch mit Abstand die größten detektierten Maximalwerte bei den Flavanonen auf. Die niedrigsten Konzentrationen in beiden Pflanzenorganen zeigen *S. repens*, *S. elaeagnos* und *S. dasyclados*. Dabei präferieren die letzteren beiden tendenziell die Triebe. Alle anderen zeigen höhere Werte in den Trieben. Bei Betrachtung des Hybriden *S. caprea* x *cinerea* fällt auf, dass er zwar in den Blättern einen vergleichbaren niedrigen Wert aufweist, jedoch die Akkumulierung der Flavanone in den Trieben im Vergleich zu beiden Eltern-Arten deutlich supprimiert ist. Beim Vergleich der beiden Pärchen der *S. caprea* und *S. daphnoides* sind keine besonderen Unterschiede ersichtlich.

Tabelle 6-5: Maximale und minimale Flavanon-Gehalte in den untersuchten *Salix* Spezies. Die Daten wurden mit einer RP-18 UPLC® Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Um die Gesamtgehalte zu ermitteln, wurden die Konzentrationen aller Peaks aufsummiert. Die Ergebnisse sind als µmol Flavanone je g Droge, berechnet als Hesperetin aufgeführt.

		<i>S. pentandra</i> ♂	<i>S. alba</i> ♂	<i>S. fragilis</i> ♀	<i>S. caprea</i> ♀	<i>S. caprea</i> ♂	<i>S. caprea x cinerea</i> ♂	<i>S. cinerea</i> ♂	<i>S. dasyclados</i> ♂	<i>S. elaeagnos</i> ♀	<i>S. daphnoides</i> ♀	<i>S. daphnoides</i> ♂	<i>S. repens</i> ♀	<i>S. purpurea</i> ♀
Blätter	max Gehalt [µmol/g]	0,4	0,0	12,1	0,7	0,2	0,6	0,4	2,5	2,2	0,8	1,4	0,9	98,7
	max Monat	Juni	Mai	Mai	Sept.	Sept.	Aug.	Juni	Aug.	Aug.	Mai	Juni	Juni	Aug.
	min Gehalt [µmol/g]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	29,3
	min Monat	Juli	Mai	Sept.	Juni	Mai	Mai	Mai	Mai	Mai	Juni	Mai	Juli	Mai
Triebe	max Gehalt [µmol/g]	6,7	3,1	11,5	10,7	9,0	2,9	14,4	0,9	0,5	1,8	3,6	0,9	39,4
	max Monat	Juni	Aug.	Juli	Aug.	Aug.	Aug.	Juli	Sept.	Aug.	Sept.	Aug.	Juli	Aug.
	min Gehalt [µmol/g]	1,3	0,0	0,8	0,0	1,2	0,9	2,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	7,4
	min Monat	Sept.	Juni	Sept.	Juni	Juni	Juni	Juni	Juni	Juni	Juni	Juni	Juni	Sept.

In **Abb. 6-32 - 6-35** sind die Jahresverläufe der Gesamtkonzentrationen und Anzahl an detektierten Flavanonen gezeigt. Innerhalb des Subgenus *Salix* fällt zunächst *S. pentandra* auf (**Abb. 6-32**). Weisen die anderen beiden Vertreter (*S. alba* und *S. fragilis*) entweder im Juli oder August einen Höhepunkt in den Trieben auf, zeigt *S. pentandra* dagegen einen stetigen Rückgang der Flavanone in diesem Pflanzenteil. Bzgl. der Gehalte in den Blättern ist *S. fragilis* erwähnenswert. Diese zeigt im Mai das Maximum der Akkumulation, gefolgt von einem kontinuierlichen Abbau des Gehalts. Die beiden anderen Arten (*S. alba* und *S. pentandra*) zeigen dazu im Gegensatz über den gesamten Beobachtungszeitraum nur niedrige Werte in den Blättern. Alle untersuchten Weiden zeichnen sich durch tendenziell höhere Flavanongehalte in den Trieben aus. Von dieser Beobachtung weichen lediglich vier Spezies ab: *S. repens*, *S. dasyclados*, *S. elaeagnos* (alle: **Abb. 6-34**) und *S. purpurea* (**Abb. 6-35**). Die letztgenannten drei Vertreter zeigen immer den höheren Gehalt in den Blättern. Die *S. repens* zeigt dagegen wechselnde aber auch sehr niedrige Flavanongehalte während des Untersuchungszeitraums in den Blättern und Trieben. Die Verläufe innerhalb der untersuchten Weiden der Sektion *Vetrix* (**Abb. 6-33**) sind sehr ähnlich, sodass hier bzgl. der Hybridisierung keine besonderen Erkenntnisse gewonnen werden können. Beim Vergleich der beiden Geschlechter von *S. daphnoides* (**Abb. 6-34**) fällt auf, dass das ♀ von Juni bis September niedrige

Konzentrationen an Flavanonen in den Blättern zeigt. Beim ♂ hingegen wird diese Stoffgruppe lediglich im Mai im genannten Pflanzenteil gefunden. Bzgl. der Triebe sind die Verläufe wieder recht ähnlich. Stellt man die Verläufe der detektierten Anzahl an Flavanonen den Konzentrationsverläufen gegenüber, ist auch hier eine gewisse Proportionalität der beiden Kurven in allen untersuchten Proben festzustellen werden.

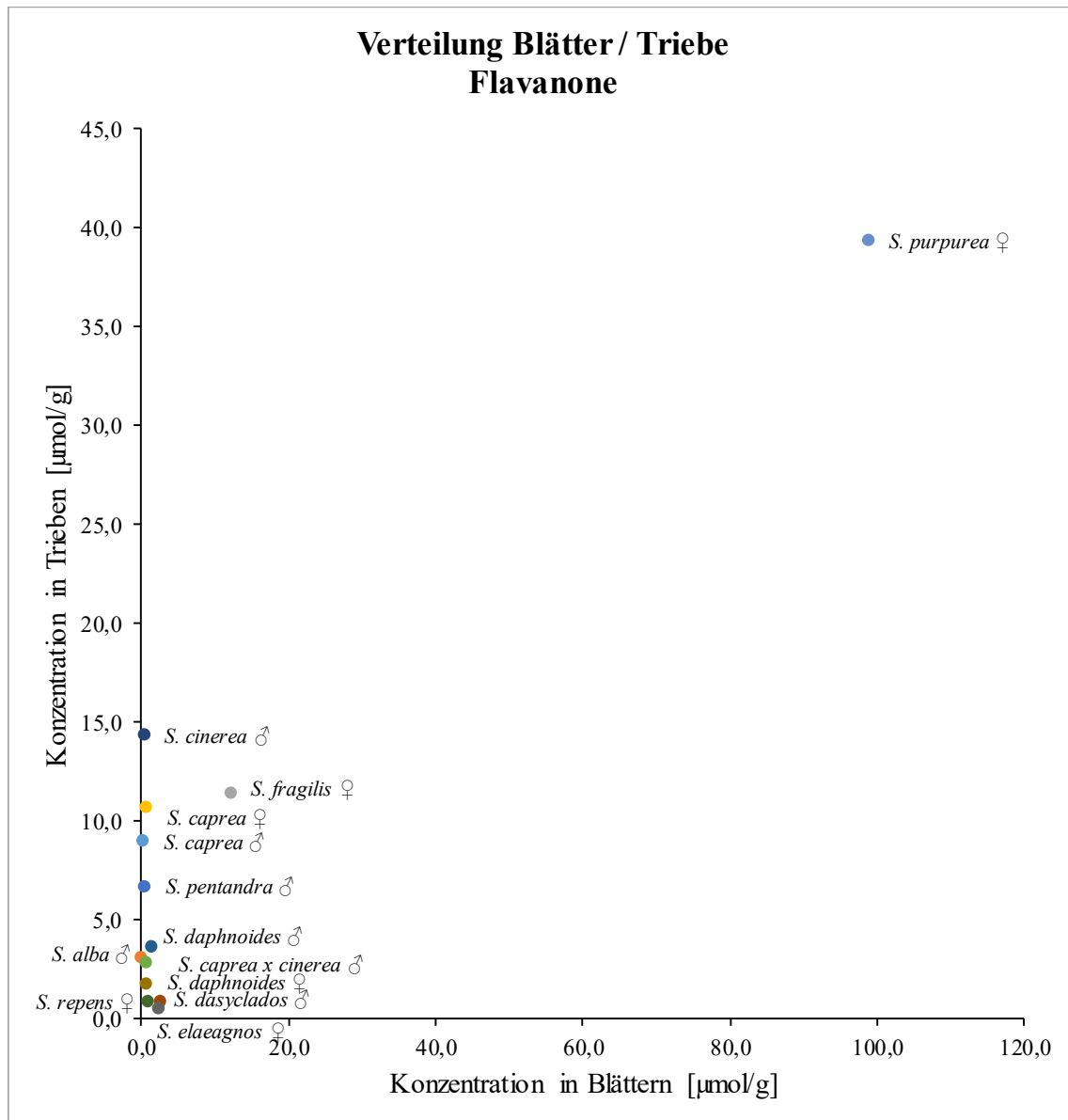


Abb. 6-31: Graphische Darstellung der Verteilung der Flavanone zwischen den Blättern und Trieben. In dieser Darstellung wurden die maximalen Werte für jede Probe berücksichtigt, die während der Wachstumsaison erreicht wurden. Die Konzentrationen sind in µmol Flavanone je g Droge, berechnet als Hesperetin angegeben.

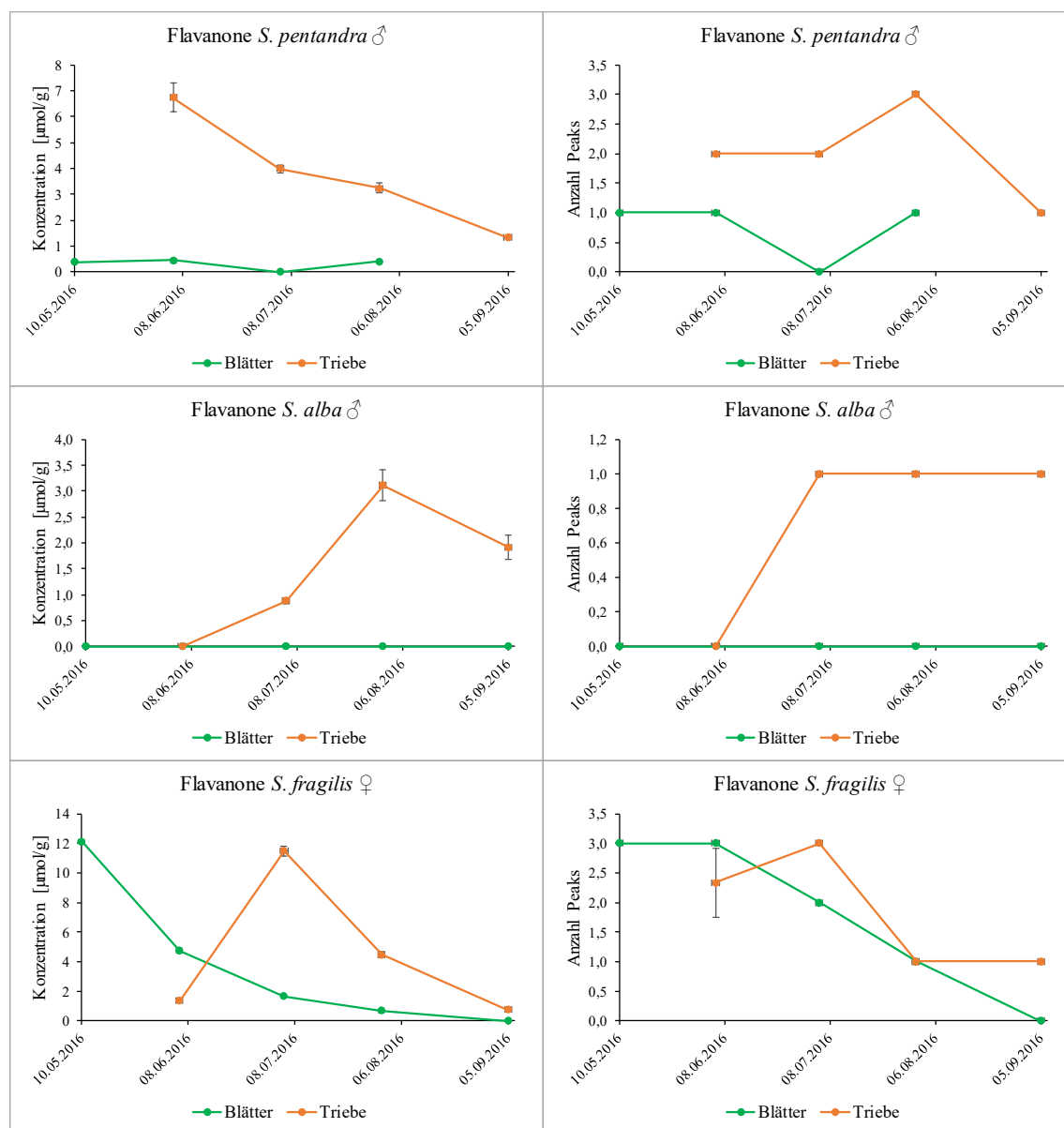


Abb. 6-32: Übersicht zum Jahresverlauf der Flavanone bei den Vertretern des Subgenus *Salix*. Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC[®] RP-18 Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Auf der linken Seite sind die Konzentrationsverläufe in μmol Analyt je g Drogenmaterial \pm SD ($n = 3$), berechnet als Hesperetin aufgeführt. Die rechte Seite zeigt die Anzahl \pm SD ($n = 3$) berücksichtigter Peaks in den Proben.

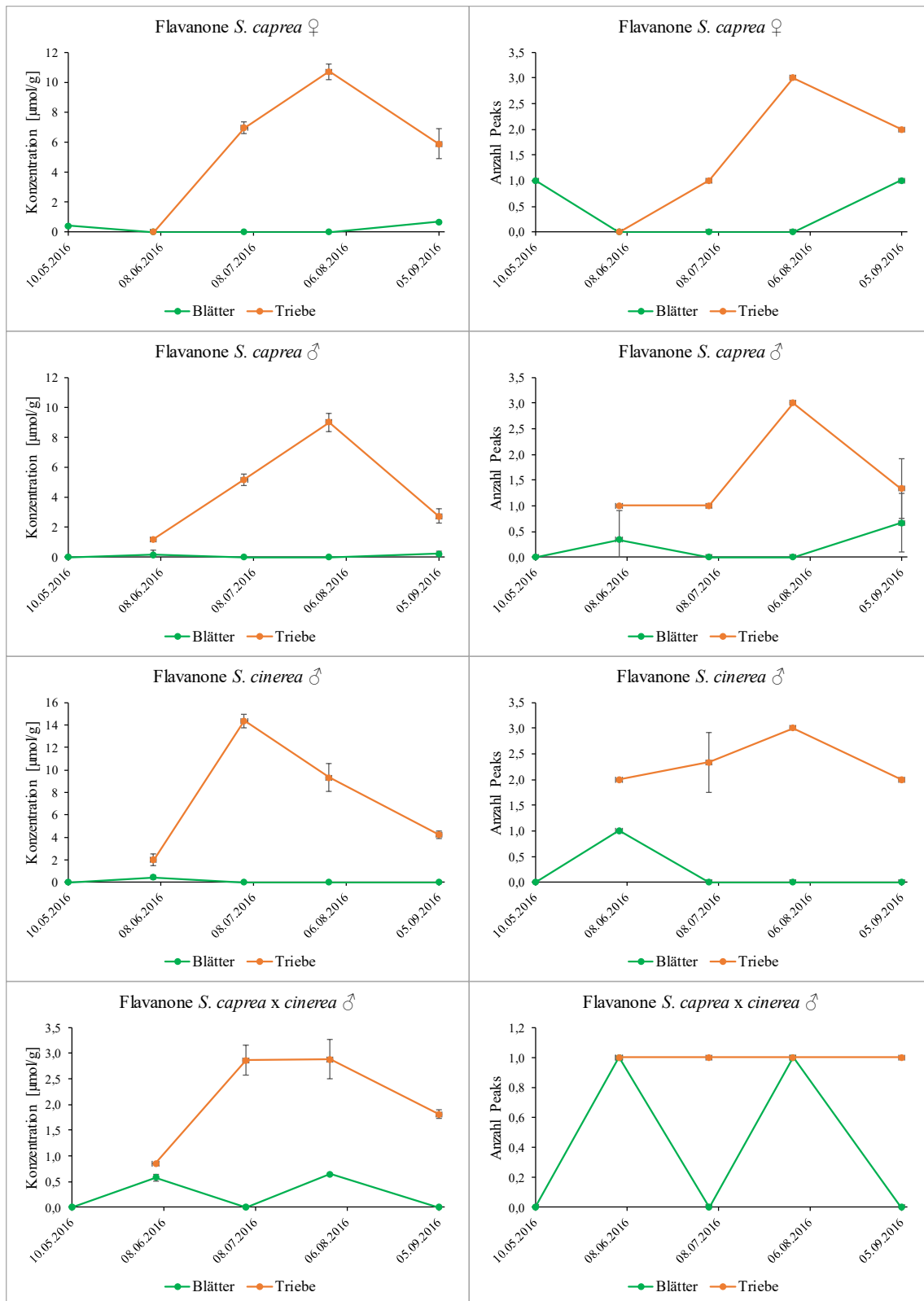


Abb. 6-33: Übersicht zum Jahresverlauf der Flavanone bei den Vertretern des Subgenus *Vetrix* und Sektion *Vetrix*. Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC® RP-18 Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Auf der linken Seite sind die Konzentrationsverläufe in µmol Analyt je g Drogenmaterial ± SD (n = 3), berechnet als Hesperetin aufgeführt. Die rechte Seite zeigt die Anzahl ± SD (n = 3) berücksichtigter Peaks in den Proben.

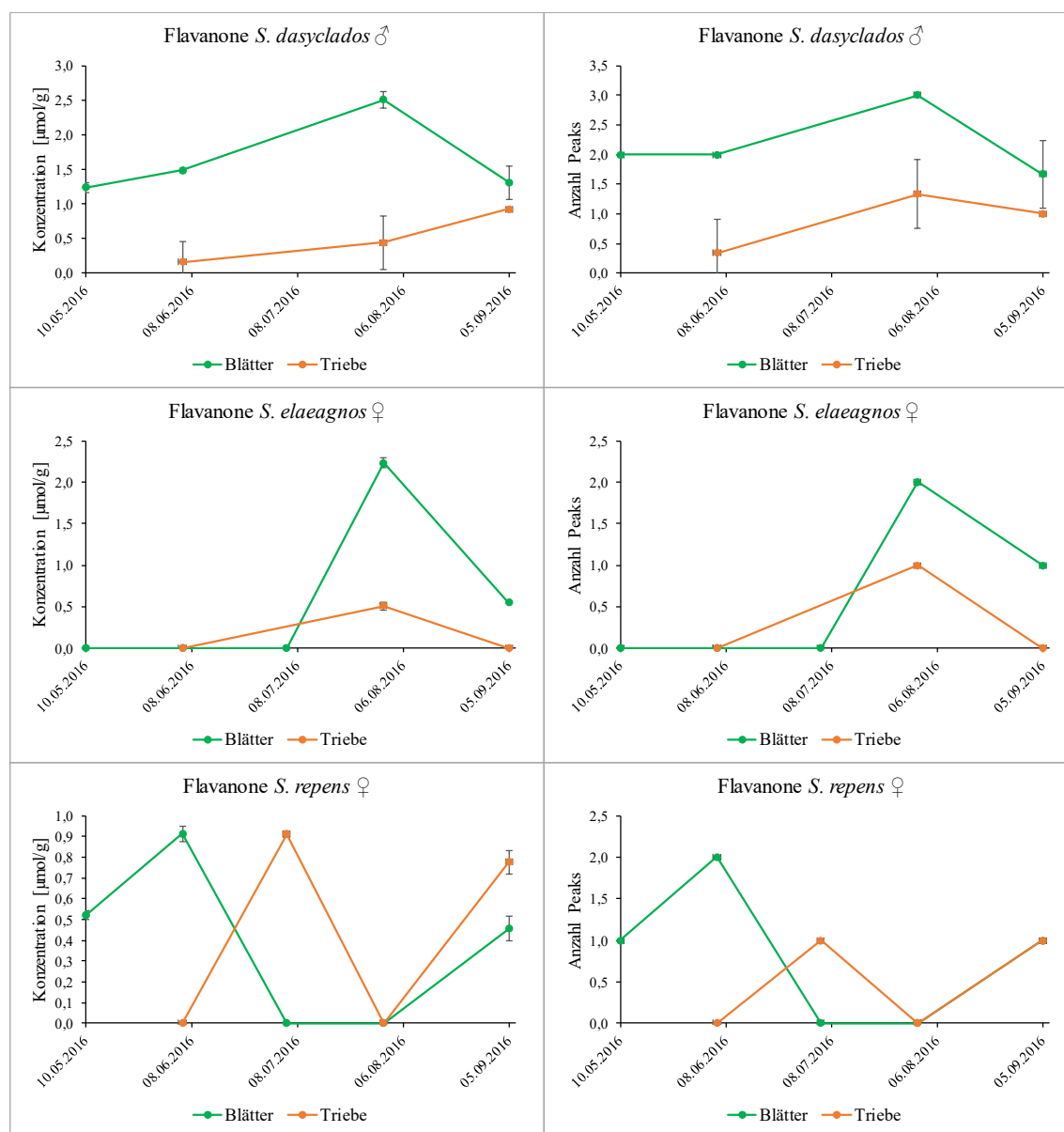


Abb. 6-34: Übersicht zum Jahresverlauf der Flavanone bei den Vertretern des Subgenus *Vetrix* und Sektionen *Vimen* (*S. dasyclados*), *Canae* (*S. elaeagnos*) und *Incubaceae* (*S. repens*). Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC® RP-18 Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Auf der linken Seite sind die Konzentrationsverläufe in µmol Analyt je g Drogenmaterial ± SD (n = 3), berechnet als Hesperetin aufgeführt. Die rechte Seite zeigt die Anzahl ± SD (n = 3) berücksichtigter Peaks in den Proben.

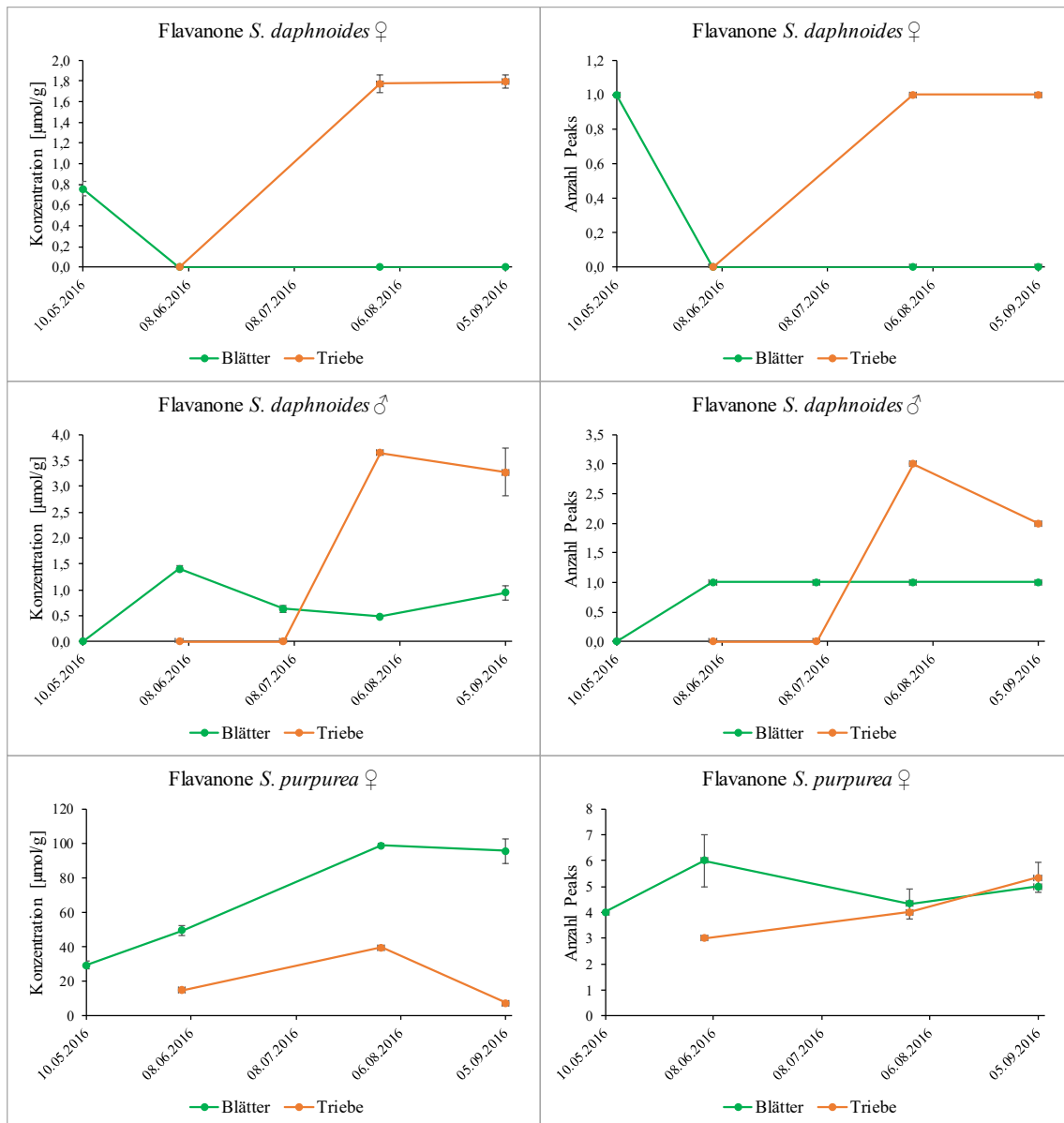


Abb. 6-35: Übersicht zum Jahresverlauf der Flavanone bei den Vertretern des Subgenus *Vetrix* und Sektionen *Daphnella* (*S. daphnoides*) und *Helix* (*S. purpurea*). Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC® RP-18 Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Auf der linken Seite sind die Konzentrationsverläufe in µmol Analyt je g Drogenmaterial ± SD (n = 3), berechnet als Hesperetin aufgeführt. Die rechte Seite zeigt die Anzahl ± SD (n = 3) berücksichtigter Peaks in den Proben.

6.2.6 Vergleichende Bewertung der Flavonoide und Chalkone

In **Tabelle 6-6** sind die minimalen und maximalen Werte der Konzentrationen der Flavanoide, bzw. Chalkone, mit ihren korrespondierenden Monaten aufgeführt. Aufgrund der sehr ähnlichen UV-Maxima im längerwelligen UV-Bereich von 330 – 380 nm wurden diese beiden Stoffgruppen zusammengefasst (vgl. Kapitel **6.5.6** und Beispielchromatogramm mit UV-Spektrum in **Abb. 6-56** aus demselben Kapitel). Beispiele, die zu dieser Gruppe zählen sind das Chalkon Isosalipurposid, die Flavonole Quercetin, Kämpferol und deren Derivate und Flavone wie Luteolin, Apigenin und deren Derivate. Da die Flavan-3-ole und Flavanone UV-Maxima in einem anderen UV-Bereich aufweisen (< 300 nm) können diese gesondert betrachtet werden. In den Blättern wurden die größten Gehalte entweder am Anfang (Mai) oder am Ende (August und September) des Beobachtungszeitraums registriert. In den Trieben ist der Juni der Monat in dem tendenziell die höchsten Gehalte auftreten. Die Minimalwerte sind in den Blättern und in den Trieben am häufigsten im Juni zu finden.

In **Abb. 6-36** ist die Verteilung der maximalen Konzentrationen dieser Verbindungen zwischen den untersuchten Pflanzenteilen dargestellt. Dabei wurde über den gesamten Probensatz festgestellt, dass die Blätter das bevorzugte Ablagerungsorgan sind. *S. alba* weist deutlich die höchsten Gehalte in den Trieben auf. Die beiden Geschlechter von *S. daphnoides* zeigen die höchsten Werte in den Blättern. Dabei hebt sich hier das ♀ gegenüber dem ♂ mit erhöhten Konzentrationen in Trieben ab. Letztere Weide ist gemessen an ihrem Gehalt in den Trieben auf einem Niveau mit *S. purpurea*, *S. fragilis* und beiden *S. caprea*.

Die letztgenannten können aufgrund vergleichbarer Konzentrationen in den Blättern als Gruppe zusammengefasst werden. Weiter sind *S. repens* und *S. pentandra* zu nennen. Beide zeichnen sich durch leicht erhöhte Gehalte in den Trieben aus (*S. repens*: 4,6 $\mu\text{mol/g}$; *S. pentandra*: 4,8 $\mu\text{mol/g}$), wobei sie, zusammen mit den übrigen Arten, in den Blättern die niedrigeren Werte aufweisen (24,0 – 41,9 $\mu\text{mol/g}$). In allen anderen nicht explizit erwähnten Spezies konnten keine nennenswerten Gehalte in den Trieben detektiert werden. Da sowohl der Hybrid *S. caprea* x *cinerea* als auch *S. cinerea* in dieser letzten Gruppe zu finden sind, kann aufgrund dieser Untersuchungen eine größere Ähnlichkeit zwischen diesen beiden Arten postuliert werden.

Tabelle 6-6: Maximale und minimale Flavonoid- / Chalkon-Gehalte in den untersuchten *Salix* Spezies. Die Daten wurden mit einer RP-18 UPLC[®] Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Um die Gesamtgehalte zu ermitteln, wurden die Konzentrationen aller Peaks aufsummiert. Die Ergebnisse sind als µmol Flavonoide / Chalkone je g Droge, berechnet als Quercetin aufgeführt.

		<i>S. pentandra</i> ♂	<i>S. alba</i> ♂	<i>S. fragilis</i> ♀	<i>S. caprea</i> ♀	<i>S. caprea</i> ♂	<i>S. caprea x cinerea</i> ♂	<i>S. cinerea</i> ♂	<i>S. dasyclados</i> ♂	<i>S. elaeagnos</i> ♀	<i>S. daphnoides</i> ♀	<i>S. daphnoides</i> ♂	<i>S. repens</i> ♀	<i>S. purpurea</i> ♀
Blätter	max Gehalt [µmol/g]	34,6	61,1	64,5	63,0	47,8	30,4	26,9	24,0	41,9	102,3	111,3	30,1	61,0
	max Monat	Aug.	Aug.	Sept.	Mai	Mai	Aug.	Sept.	Sept.	Mai	Juni	Mai	Aug.	Aug.
	min Gehalt [µmol/g]	19,5	31,5	20,9	30,4	30,7	13,3	9,7	14,8	12,1	71,9	81,0	10,3	34,9
	min Monat	Juli	Juni	Juni	Juni	Juli	Sept.	Mai	Juni	Sept.	Sept.	Sept.	Juni	Juni
Triebe	max Gehalt [µmol/g]	4,8	20,7	10,4	10,6	10,6	0,0	0,9	0,2	0,0	17,4	11,3	4,6	12,3
	max Monat	Sept.	Juni	Aug.	Aug.	Aug.	Juni	Sept.	Juni	Juni	Juni	Juni	Sept.	Juni
	min Gehalt [µmol/g]	1,2	6,4	1,1	3,9	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,1	3,9	0,0	9,5
	min Monat	Juni	Sept.	Juli	Juni	Sept.	Juni	Juli	Aug.	Juni	Sept.	Aug.	Juni	Aug.

In **Abb. 6-37 - 6-40** sind die detaillierten Jahresverläufe aller untersuchten Weiden aufgeführt. Dabei wurden zum einen die summierten Gesamtgehalte und die Anzahl berücksichtigter Verbindungen betrachtet. Wie sich bereits durch die bisher vorgestellten Ergebnisse andeutete, bestätigte sich hier die Dominanz der Flavonoide und Chalkone in den Blättern. Es konnte über den gesamten Beobachtungszeitraum in allen Proben nie ein größerer Wert in den Trieben als in den Blättern gefunden werden. Bis auf wenige Ausnahmen zeigen alle untersuchten *Salix* Spezies in den Blättern einen ähnlichen Verlauf. Zwischen Mai und Juni (*S. pentandra*, *S. caprea*: Mai bis Juli) ist ein Rückgang der Gesamtkonzentration dieser Stoffgruppe zu verzeichnen. Diesem anfänglichen Trend folgt ein deutlicher Anstieg bis zum August. Von diesem Zeitpunkt an stagnieren die Werte oder zeigen eine leichte Minderung der Gehalte bis zum September. Eine Ausnahme von dieser Beobachtung macht *S. fragilis* (**Abb. 6-37**), da diese bis einschließlich des letzten Probenzugdatums einen Anstieg der Konzentrationen zeigt. Noch deutlicher hob sich *S. cinerea* (**Abb. 6-38**) ab. Hier ist ein stetiger Anstieg in den Blättern zu verzeichnen. Selbige Weide zeigt keine nennenswerten Gehalte in den Trieben, ebenso wie der Bastard *S. caprea x cinerea*. Damit scheinen beide recht ähnlich zu sein. Dagegen wurden in den Trieben der *S. caprea* Individuen vergleichsweise hohe Konzentrationen detektiert. Jedoch ähnelt der Jahresverlauf der Blätter des Hybriden eher den beiden *S. caprea*. Auch bei

beiden *S. daphnoides* (Abb. 6-40) stellt sich ein anderes Bild in den Blättern dar. Hier wurden über den gesamten Jahresverlauf absteigende Konzentrationen festgestellt. Im Gegensatz dazu wurde aber in beiden Geschlechtern eine Zunahme der Anzahl an detektierten Verbindungen dieser Klasse registriert. Bei allen anderen Arten ist die Zu-, bzw. Abnahme, der Verbindungsanzahl mit dem Verlauf der Gesamtgehalte proportional.

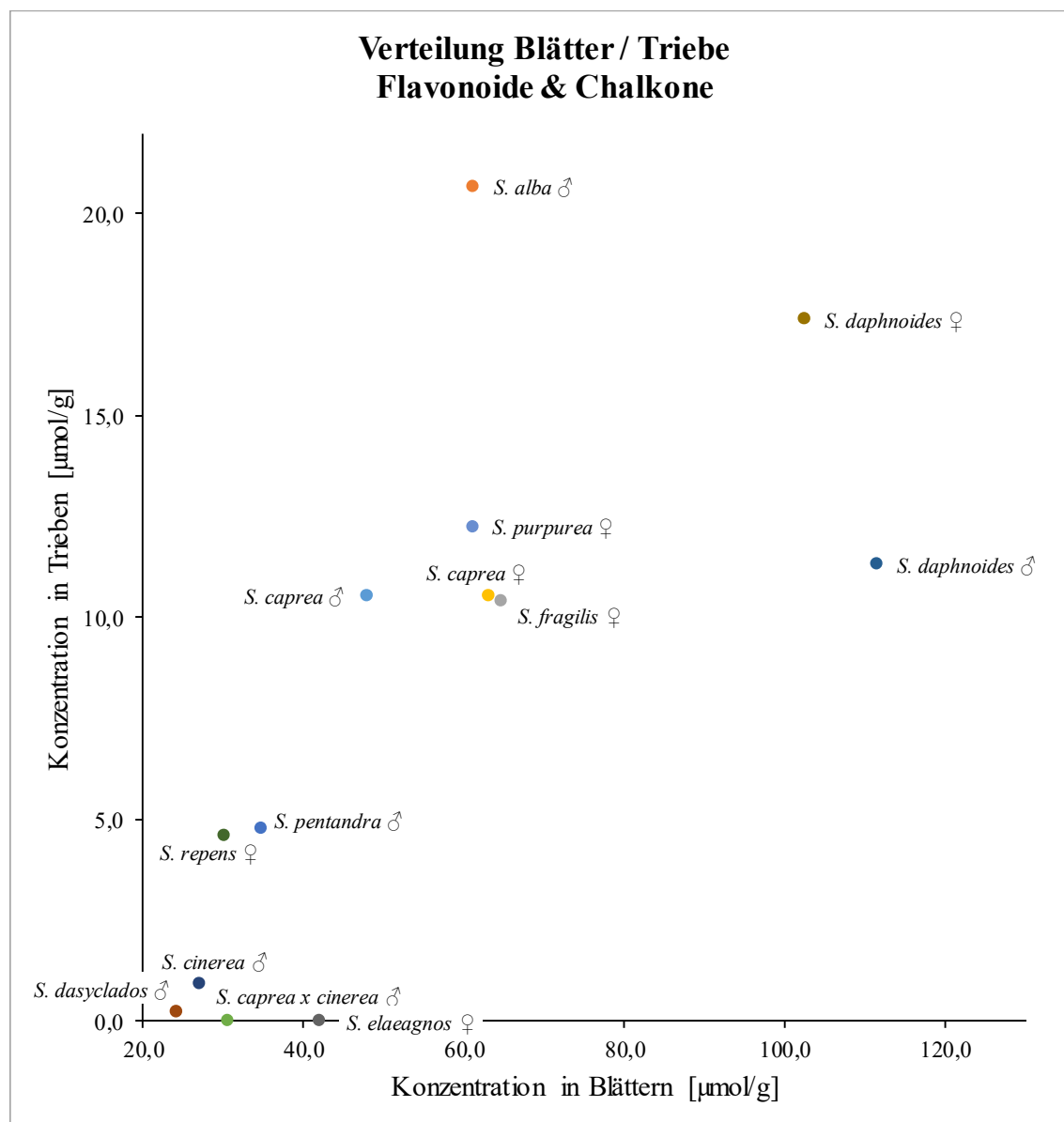


Abb. 6-36: Graphische Darstellung der Verteilung der Flavonoide / Chalkone zwischen den Blättern und Trieben. In dieser Darstellung wurden die maximalen Werte für jede Probe berücksichtigt, die während der Wachstumsaison erreicht wurden. Die Konzentrationen sind in µmol Flavonoide / Chalkone je g Droge, berechnet als Quercetin angegeben.

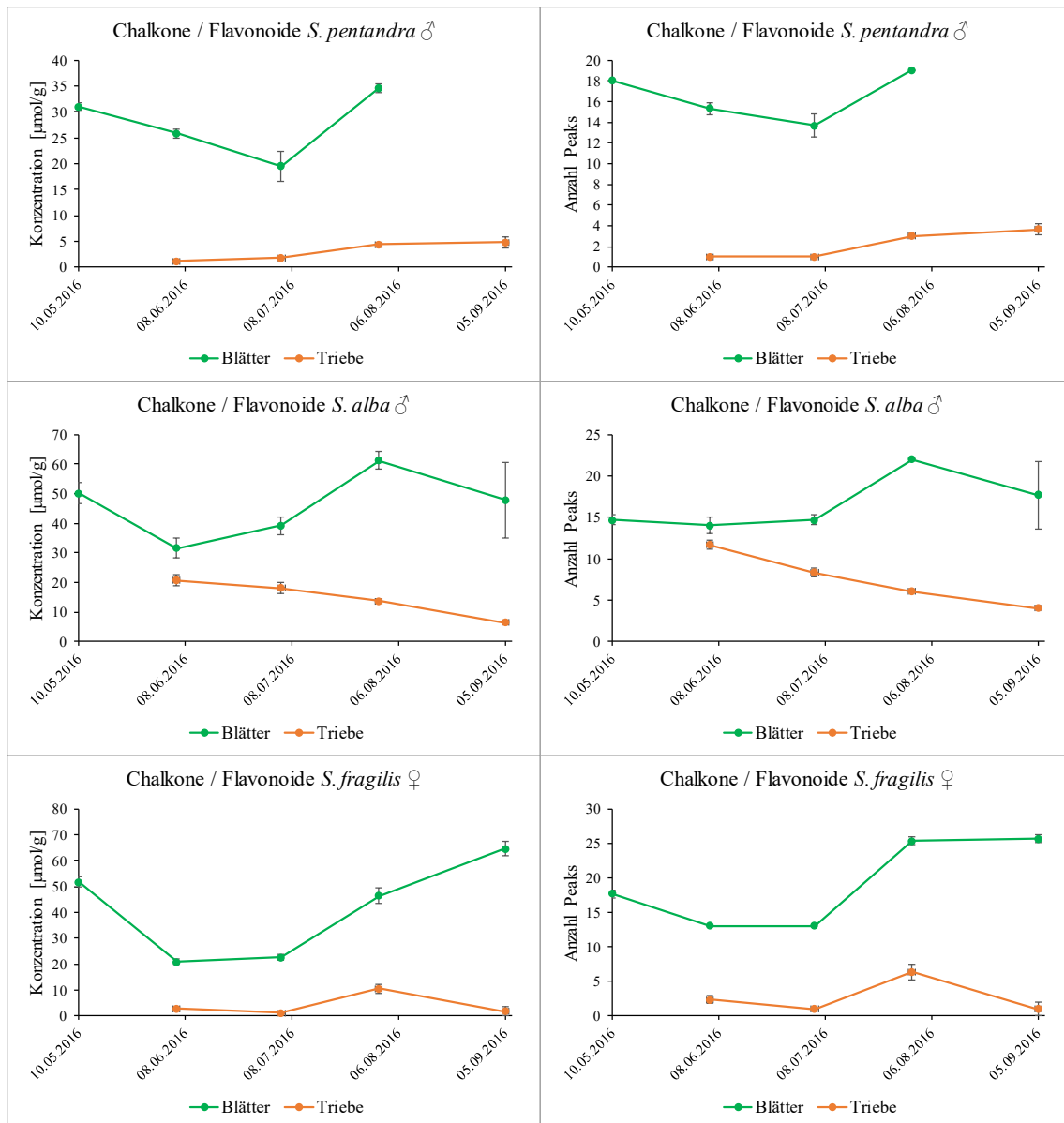


Abb. 6-37: Übersicht zum Jahresverlauf der Chalkone und Flavonoide bei den Vertretern des Subgenus *Salix*. Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC[®] RP-18 Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Auf der linken Seite sind die Konzentrationsverläufe in µmol Analyt je g Drogenmaterial ± SD (n = 3), berechnet als Quercetin aufgeführt. Die rechte Seite zeigt die Anzahl ± SD (n = 3) berücksichtigter Peaks in den Proben.

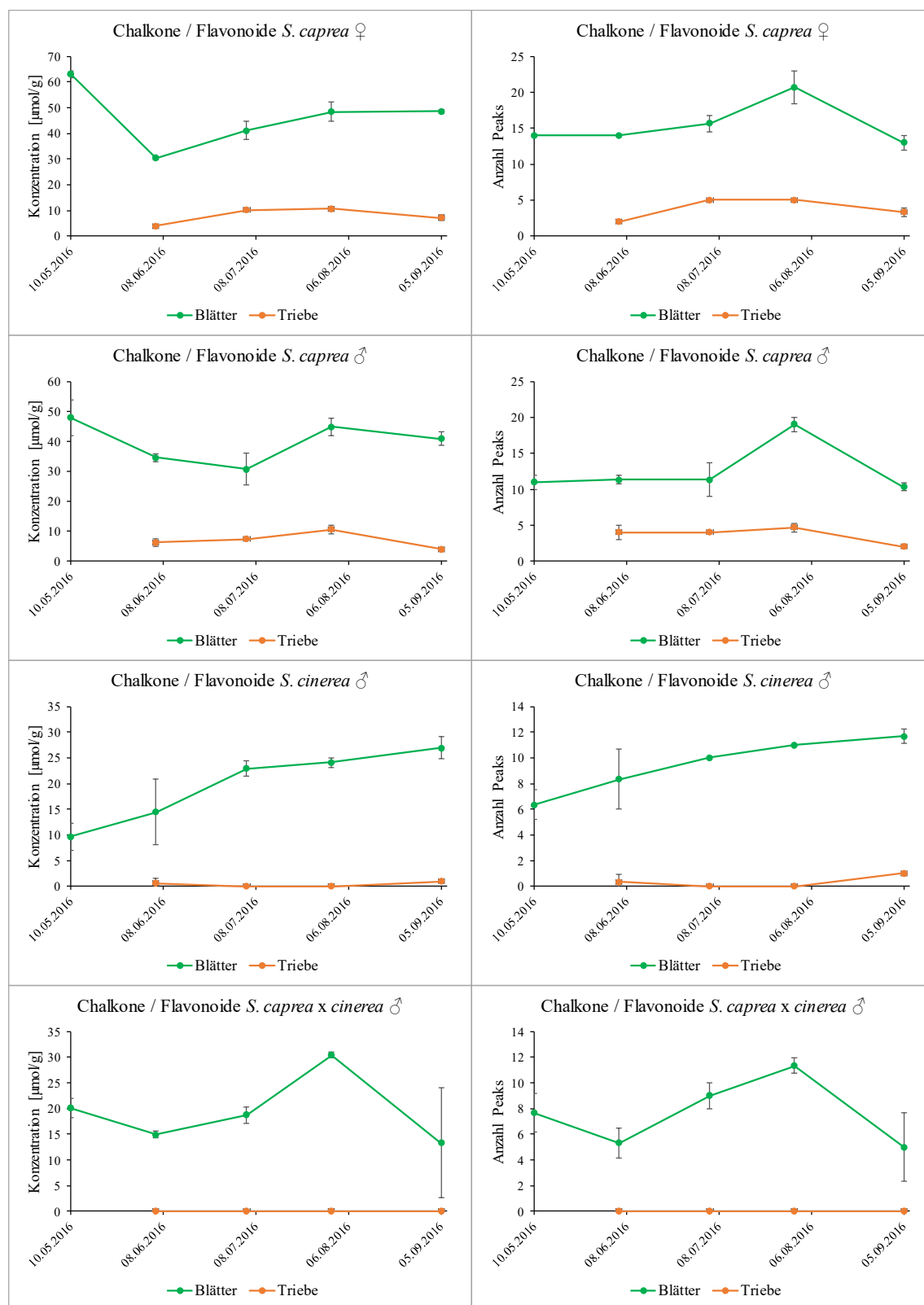


Abb. 6-38: Übersicht zum Jahresverlauf der Chalkone und Flavonoide bei den Vertretern des Subgenus *Vetrix* und Sektion *Vetrix*. Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC[®] RP-18 Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Auf der linken Seite sind die Konzentrationsverläufe in µmol Analyt je g Drogenmaterial ± SD (n = 3), berechnet als Quercetin aufgeführt. Die rechte Seite zeigt die Anzahl ± SD (n = 3) berücksichtigter Peaks in den Proben.

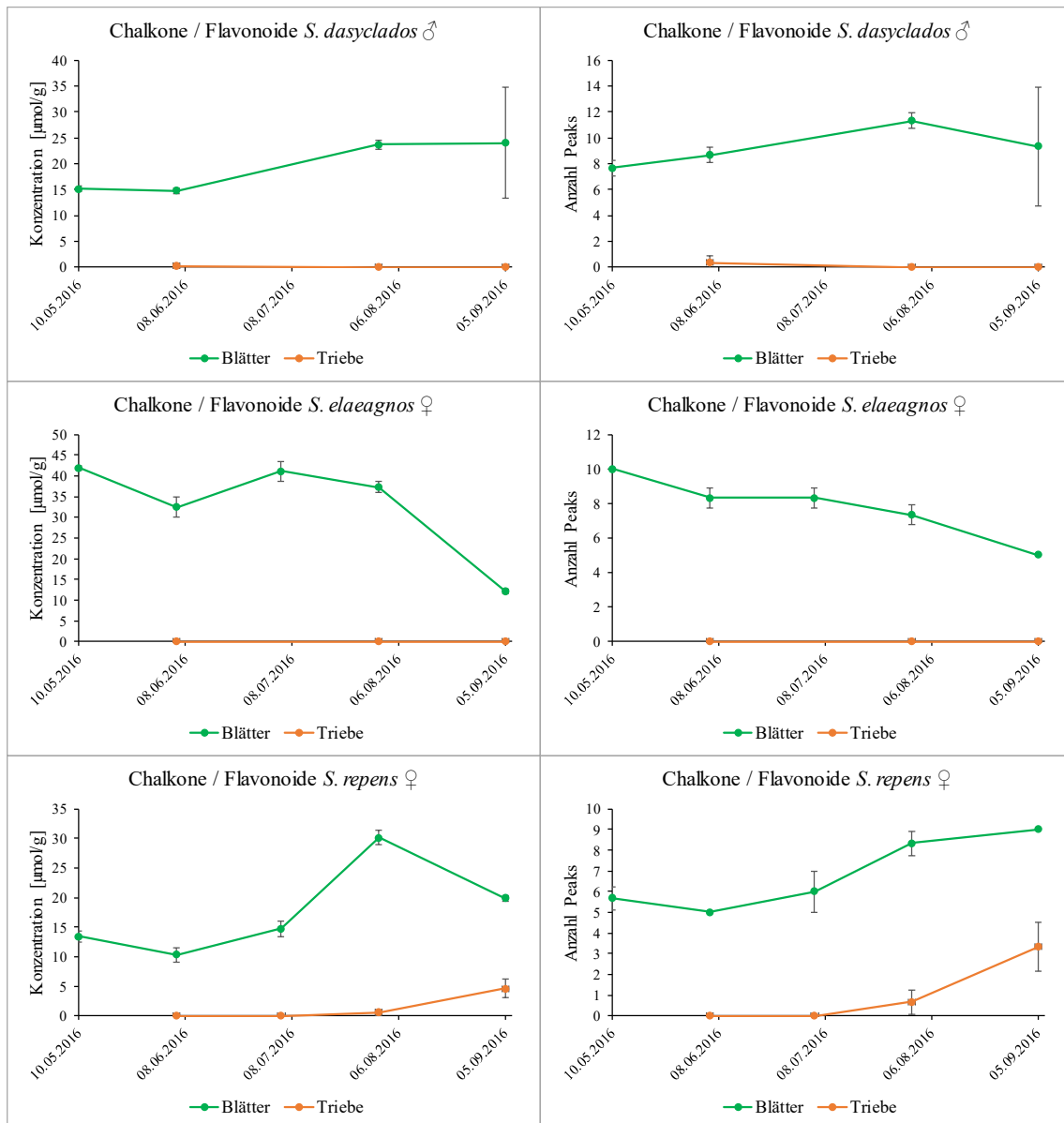


Abb. 6-39: Übersicht zum Jahresverlauf der Chalkone und Flavonoide bei den Vertretern des Subgenus *Vetrix* und Sektionen *Vimen* (*S. dasyclados*), *Canae* (*S. elaeagnos*) und *Incubaceae* (*S. repens*). Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC[®] RP-18 Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Auf der linken Seite sind die Konzentrationsverläufe in µmol Analyt je g Drogenmaterial ± SD (n = 3), berechnet als Quercetin aufgeführt. Die rechte Seite zeigt die Anzahl ± SD (n = 3) berücksichtigter Peaks in den Proben.

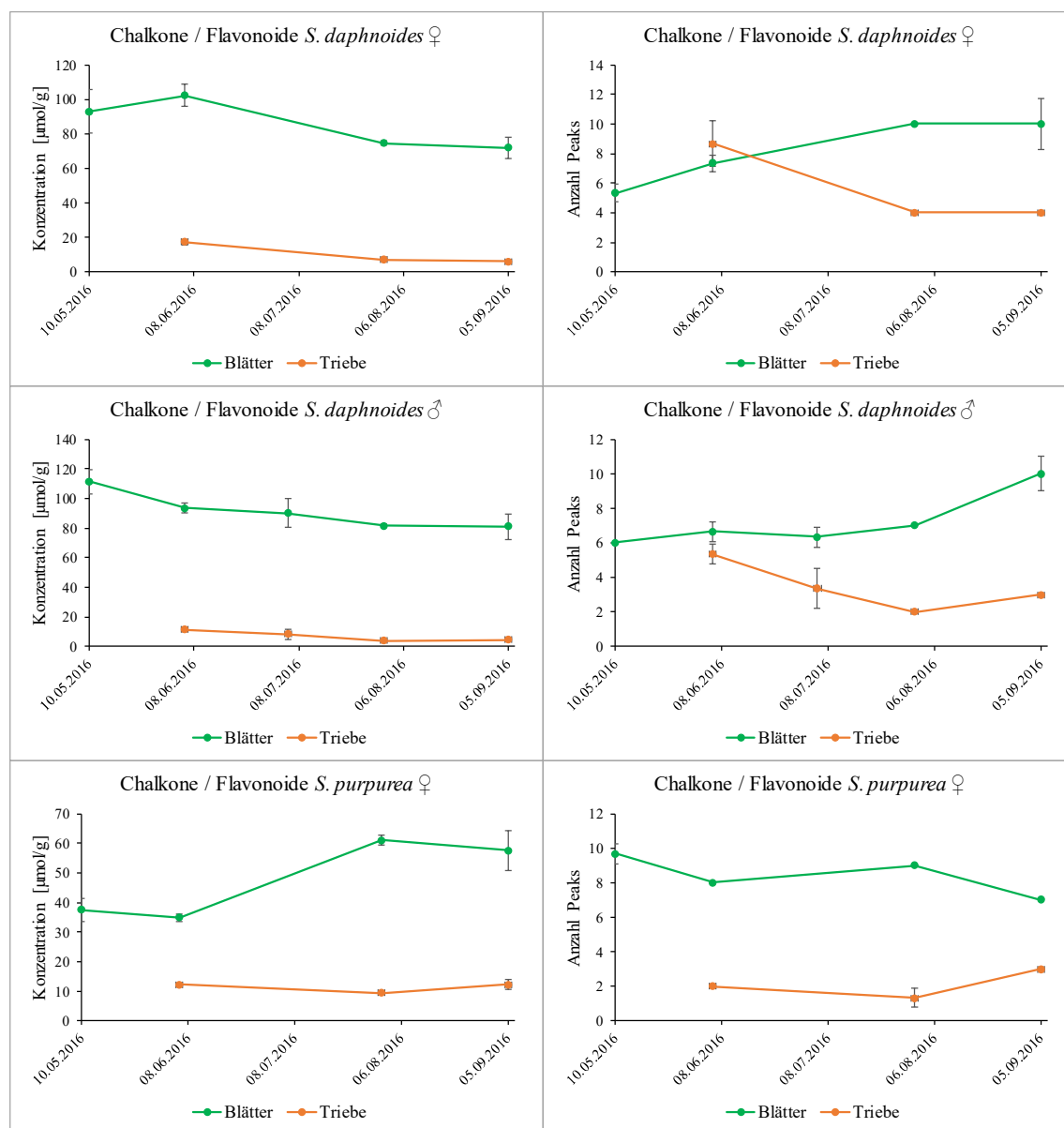


Abb. 6-40: Übersicht zum Jahresverlauf der Chalkone und Flavonoide bei den Vertretern des Subgenus *Vetrix* und Sektionen *Daphnella* (*S. daphnoides*) und *Helix* (*S. purpurea*). Die Ergebnisse wurden mit einer UPLC® RP-18 Methode (Kapitel 6.5.6) erhoben. Auf der linken Seite sind die Konzentrationsverläufe in μmol Analyt je g Drogenmaterial \pm SD ($n = 3$), berechnet als Quercetin aufgeführt. Die rechte Seite zeigt die Anzahl \pm SD ($n = 3$) berücksichtigter Peaks in den Proben.

6.2.7 Stoffgruppenübergreifende Betrachtungen

Im folgenden Kapitel sollen stoffübergreifende Korrelationen innerhalb der jeweiligen Gewebe vorgestellt werden. Dazu wurden die im Jahresverlauf erzielten Maximalwerte herangezogen. In **Abb. 6-42** sind die Flavan-3-ole mit den Salicylalkoholderivaten in den Trieben korreliert. Diese Betrachtung war dadurch motiviert, als dass für diese beiden Stoffklassen die größten Bandbreiten der Maximalwerte detektiert wurden (Salicylalkohole: 709,2 $\mu\text{mol/g}$; Flavan-3-ole: 230,5 $\mu\text{mol/g}$).

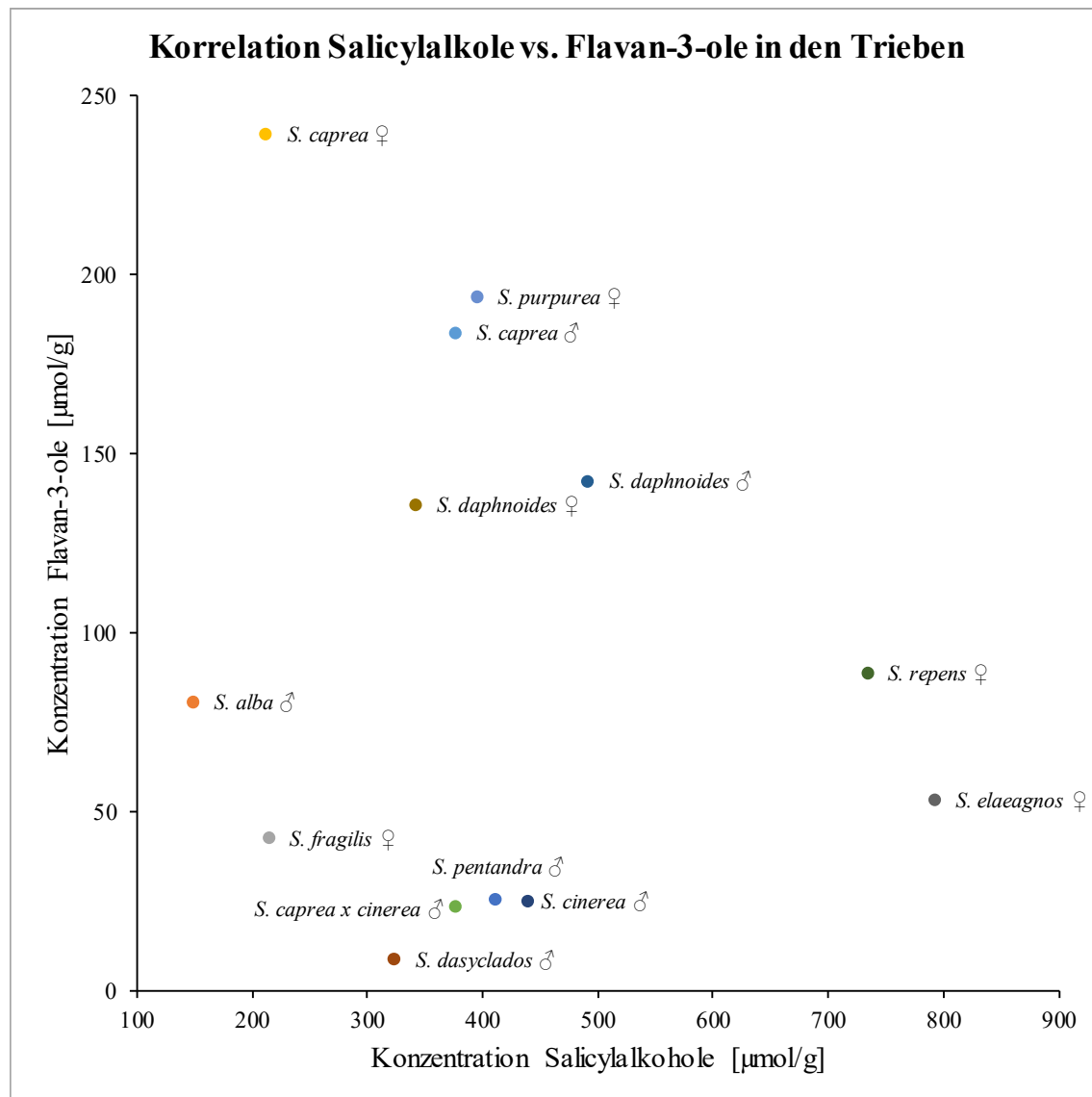


Abb. 6-41: Graphische Darstellung der Korrelation zwischen den Konzentrationen der Flavan-3-ole und den Salicylalkoholderivaten in den diesjährigen Trieben. In dieser Darstellung wurden die maximalen Werte für jede Probe berücksichtigt, die während der Wachstumsaison erreicht wurden. Die Konzentrationen sind in μmol Flavan-3-ole, berechnet als Catechin, bzw. Salicylalkoholderivate, berechnet als Salicin, je g Droge angegeben.

Bei dieser Betrachtung fiel *S. caprea* ♀ (Flavan-3-ole: 239,4 µmol/g; Salicylalkohole: 211,9 µmol/g) mit im Gegensatz zum ♂ (Flavan-3-ole: 184,1 µmol/g; Salicylalkohole: 376,2 µmol/g) erhöhten Flavan-3-ol- aber erniedrigten Salicylalkoholgehalten auf. Das ♂ konnte zusammen mit *S. purpurea* (Flavan-3-ole: 194,0 µmol/g; Salicylalkohole: 395,0 µmol/g) und beiden Geschlechtern von *S. daphnoides* (Flavan-3-ole: ♀ = 136,0 µmol/g, ♂ = 142,6 µmol/g; Salicylalkohole: ♀ = 341,6 µmol/g, ♂ = 491,1 µmol/g) in einer Gruppe zusammengefasst werden. Somit sind im Fall von *S. daphnoides* kaum geschlechtsspezifische Unterschiede auszumachen. Diese Gruppe zeigt verhältnismäßig hohe Flavan-3-ol-Konzentrationen und bewegt sich bzgl. der Salicylalkoholderivate in diesem Probenaset im Mittelfeld. *S. repens* (Flavan-3-ole: 88,9 µmol/g; Salicylalkohole: 733,7 µmol/g) und *S. elaeagnos* (Flavan-3-ole: 53,4 µmol/g; Salicylalkohole: 792,2 µmol/g) stechen hier mit den größten Extremwerten im Bereich der Salicylalkoholderivate heraus. Allerdings zeigen beide vergleichsweise niedrige Werte bei den Flavan-3-olen. Mit ähnlichem Gehalt bei den Flavan-3-olen aber mit dem niedrigsten Wert bei den Salicylalkoholen fiel *S. alba* (Flavan-3-ole: 80,8 µmol/g; Salicylalkohole: 148,3 µmol/g) auf. Alle übrigen sind mit Flavan-3-ol-Gehalten von 8,9 - 42,8 µmol/g und Salicylalkoholgehalten von 214,2 - 439,2 µmol/g gruppiert.

In **Abb. 6-42** sind die Phenylpropansäuren mit den Flavonoiden, bzw. Chalkonen, in den Blättern korreliert. Diese Betrachtung ist von besonderem Interesse, da die Phenylpropansäuren ein Substrat der Chalkon-Synthase darstellen und über dieses Enzym zusammen mit einem aus dem Polyketid-Biosyntheseweg stammenden Phloroglucinol zu einem Chalkon verknüpft werden (Winkel-Shirley, 2001). Damit kann bei Arten mit verhältnismäßig niedrigen Gehalten an Phenylpropansäuren und hohen Konzentrationen an Flavonoiden und Chalkonen eine hohe Aktivität dieses Enzyms postuliert werden. Da bereits im nächsten biosynthetischen Schritt die Flavanone durch die Chalkonisomerase gebildet werden (Winkel-Shirley, 2001), sollten diese ebenfalls in die Betrachtung bzgl. der Verwertung der Phenylpropansäuren zu Flavonoiden einbezogen werden. Bei *S. purpurea* und beiden Individuen der *S. daphnoides* ist das Verhältnis am deutlichsten zugunsten der Flavanone und Flavonoide / Chalkone verschoben. Beide verhalten sich jedoch recht ähnlich. Wie auch bei dem *S. caprea*-Pärchen, wurden zwischen beiden Geschlechtern der *S. daphnoides* keine merklichen Unterschiede bei dieser Betrachtung registriert. In dieser Darstellung setzen sich die Weiden des Subgenus *Salix* (*S. pentandra*, *S. fragilis*, *S. alba*) deutlich ab. Diese zeigen höhere Konzentrationen der Phenylpropansäuren als Flavanone und Flavonoide / Chalkone. Damit kann eine verminderte Aktivität der Chalkon-Synthase in diesem Subgenus postuliert werden, was aber noch durch weitere Untersuchungen un-

termuert werden muss. Alle weiteren Arten warten mit im Vergleich zu den Phenylpropansäuren erhöhten Konzentrationen der Flavanone und Flavonoide / Chalkone in den Blättern auf und bewegten sich in ähnlichen Konzentrationsbereichen (Phenylpropansäuren: 6,3 – 37,0 $\mu\text{mol/g}$; Flavanone und Flavonoide / Chalkone: 27,4 – 63,6 $\mu\text{mol/g}$).

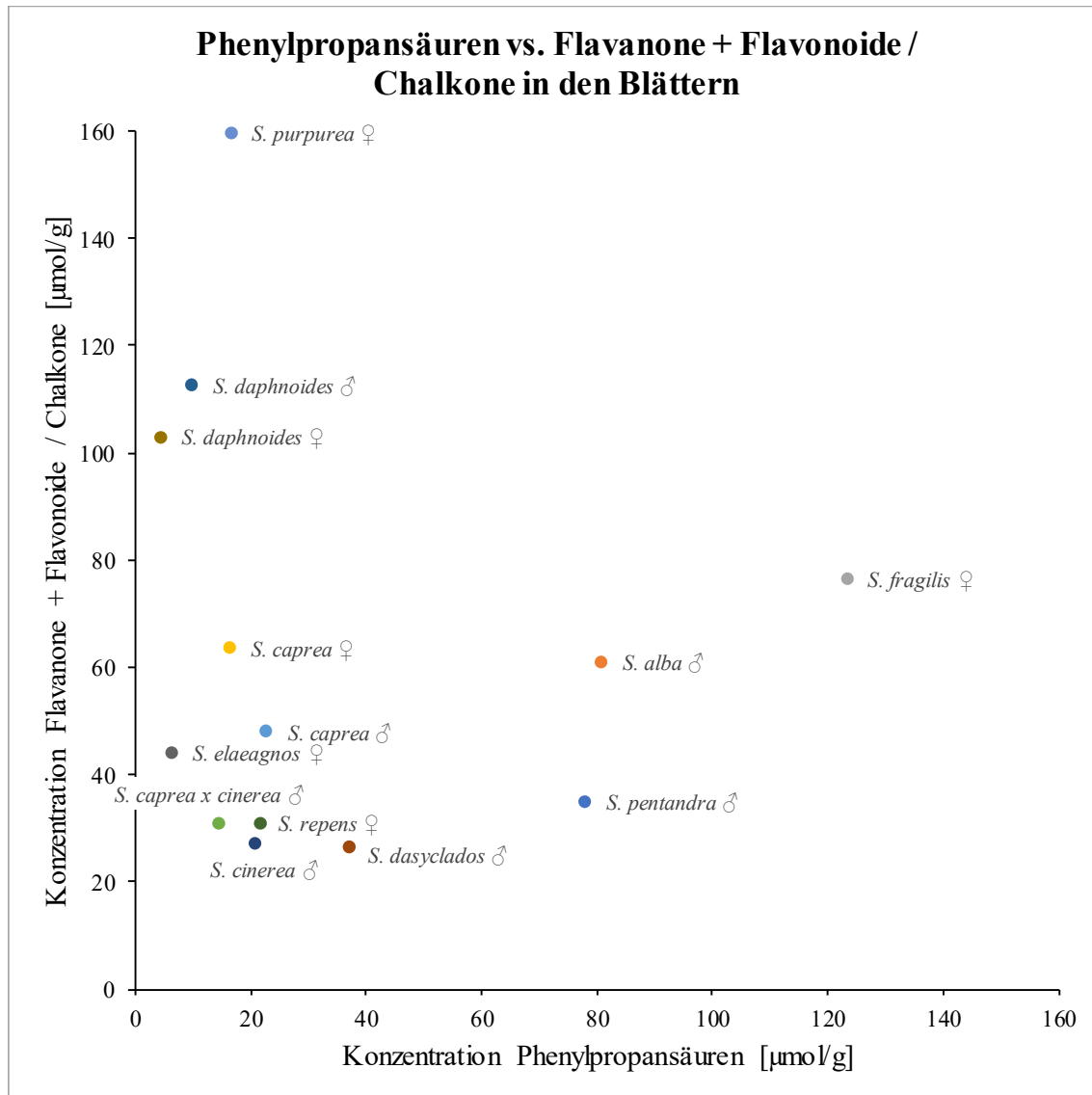


Abb. 6-42: Graphische Darstellung der Korrelation zwischen den Konzentrationen der Phenylpropansäuren und den summierten Flavanonen und Flavonoiden / Chalkonen in den Blättern. In dieser Darstellung flossen die jeweiligen maximalen Werte für jede Probe ein, die während der Wachstumsaison erreicht wurden. Die Berechnung der Konzentrationen in $\mu\text{mol je g}$ Droge erfolgte für die Phenylpropansäuren als Kaffeesäure, für die Flavanone als Hesperetin und für die Flavonoide / Chalkone als Quercetin. Die beiden letztgenannten Gruppen wurden für diese Darstellung summiert.

Eine weitere interessante Korrelation sollte zwischen den Flavanonen und den PAs untersucht werden. Um biosynthetisch zu den PAs zu gelangen, müssen zunächst die Flavanone über die

Flavanon-3-hydroxylase an Position 3 im C-Ring hydroxyliert werden. Dabei wird das 2,3-Dihydroflavonol gebildet. Letzteres wird an Position 4 des C-Rings über die Dihydroflavonol-4-reduktase zum entsprechenden Flavan-3,4-diol, bzw. Leukoanthocyanidin, reduziert. Diese Flavonoidklasse ist zusammen mit den monomeren Flavan-3-olen, die durch die Leukoanthocyanidinreduktase aus Flavan-3,4-diolen gebildet werden, ein wichtiger Baustein für die Polymerisierung der PAs (Winkel-Shirley, 2001). Daher kann ein biosynthetischer Zusammenhang zwischen Flavanonen und PAs abgeleitet werden.

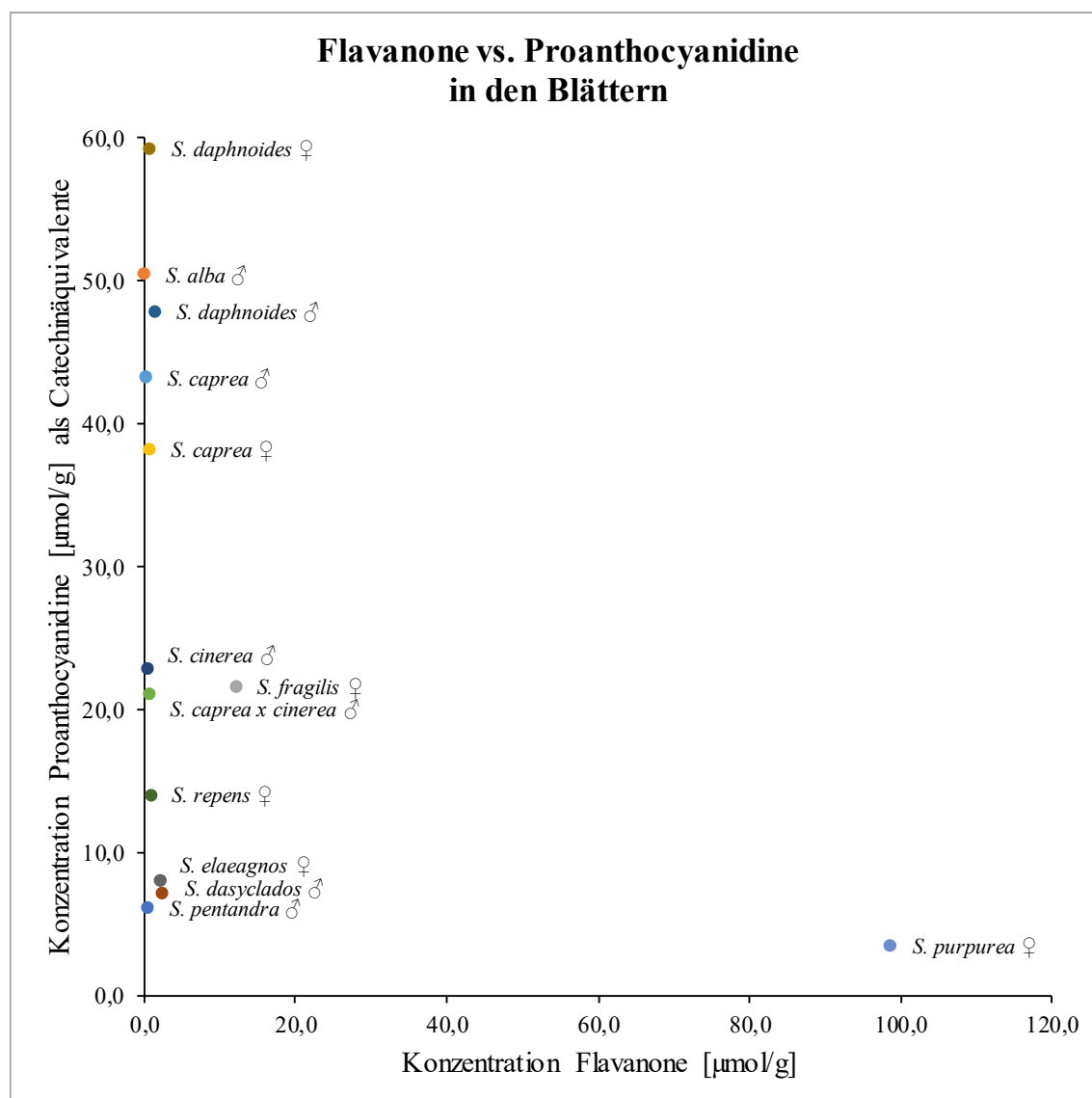


Abb. 6-43: Graphische Darstellung der Korrelation zwischen den Konzentrationen der Flavanone und den PAs in den Blättern. In dieser Darstellung wurden die maximalen Werte für jede Probe berücksichtigt, die während der Wachstumsaison erreicht wurden. Um bessere Korrelationen bzgl. der Stoffmengen herstellen zu können, wurden die PA-Gehalte in μmol Catechinäquivalente je g Droge umgerechnet. Die Konzentrationen der Flavanone sind in μmol Hesperetin je g Droge angegeben.

In **Abb. 6-43** sind die entsprechenden Korrelationen in den Blättern dargestellt. Bei allen Arten bis auf *S. purpurea* ist das Verhältnis ganz klar zugunsten der PAs verschoben. Lediglich bei *S. fragilis* konnte ein nennenswerter Wert für die Flavanone registriert werden. Bei *S. purpurea* scheint die Aktivität der genannten Enzyme im Gegensatz zu den anderen untersuchten Arten deutlich eingeschränkt zu sein, da hier das Verhältnis zugunsten der Phenylpropansäuren verschoben ist.

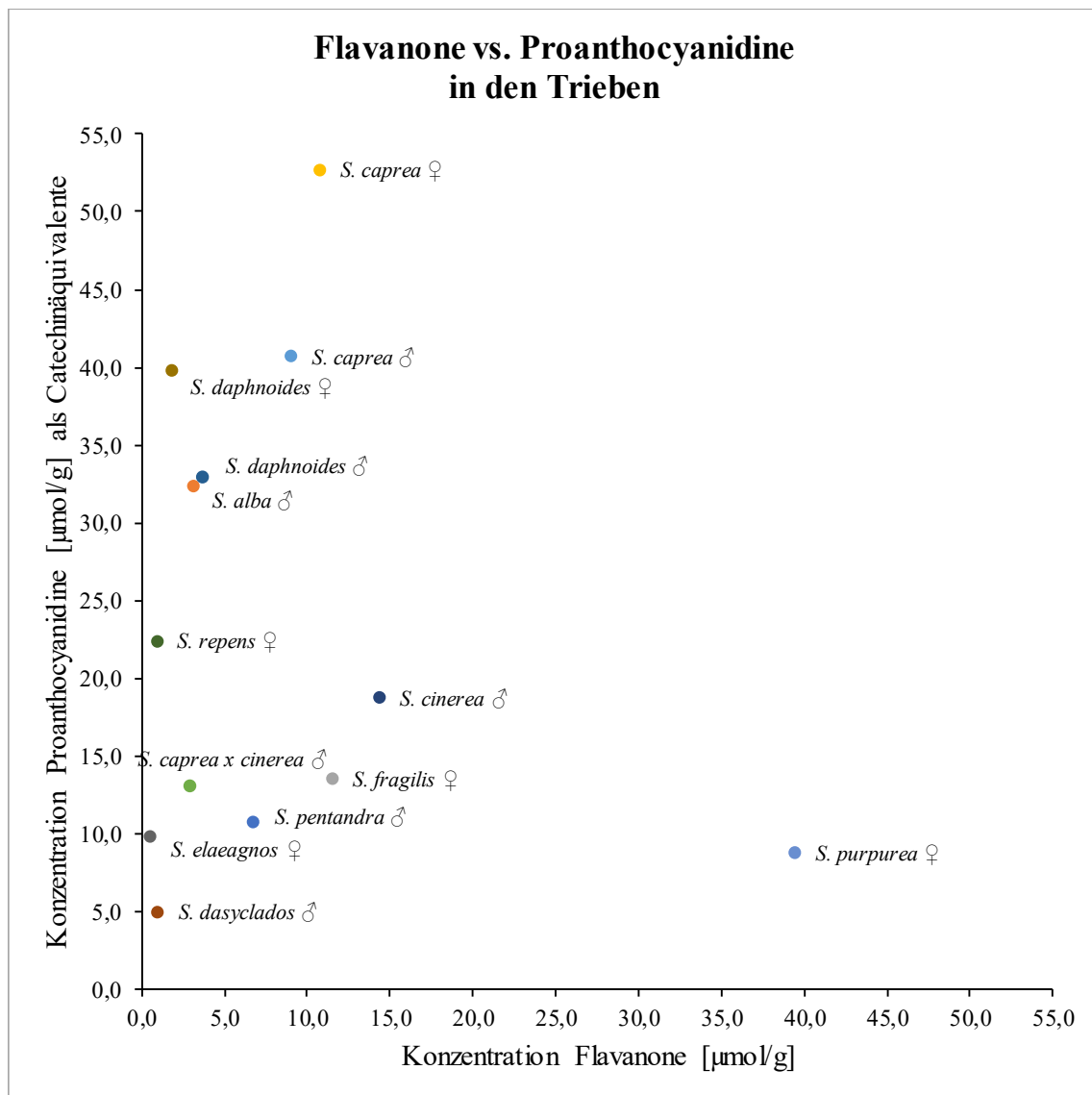


Abb. 6-44: Graphische Darstellung der Korrelation zwischen den Konzentrationen der Flavanone und den PAs in den Trieben. In dieser Darstellung wurden die maximalen Werte für jede Probe berücksichtigt, die während der Wachstumsaison erreicht wurden. Um bessere Korrelationen bzgl. der Stoffmengen herstellen zu können, wurden die PA-Gehalte in µmol Catechinäquivalente je g Droge umgerechnet. Die Konzentrationen der Flavanone sind als µmol Hesperetin je g Droge angegeben.

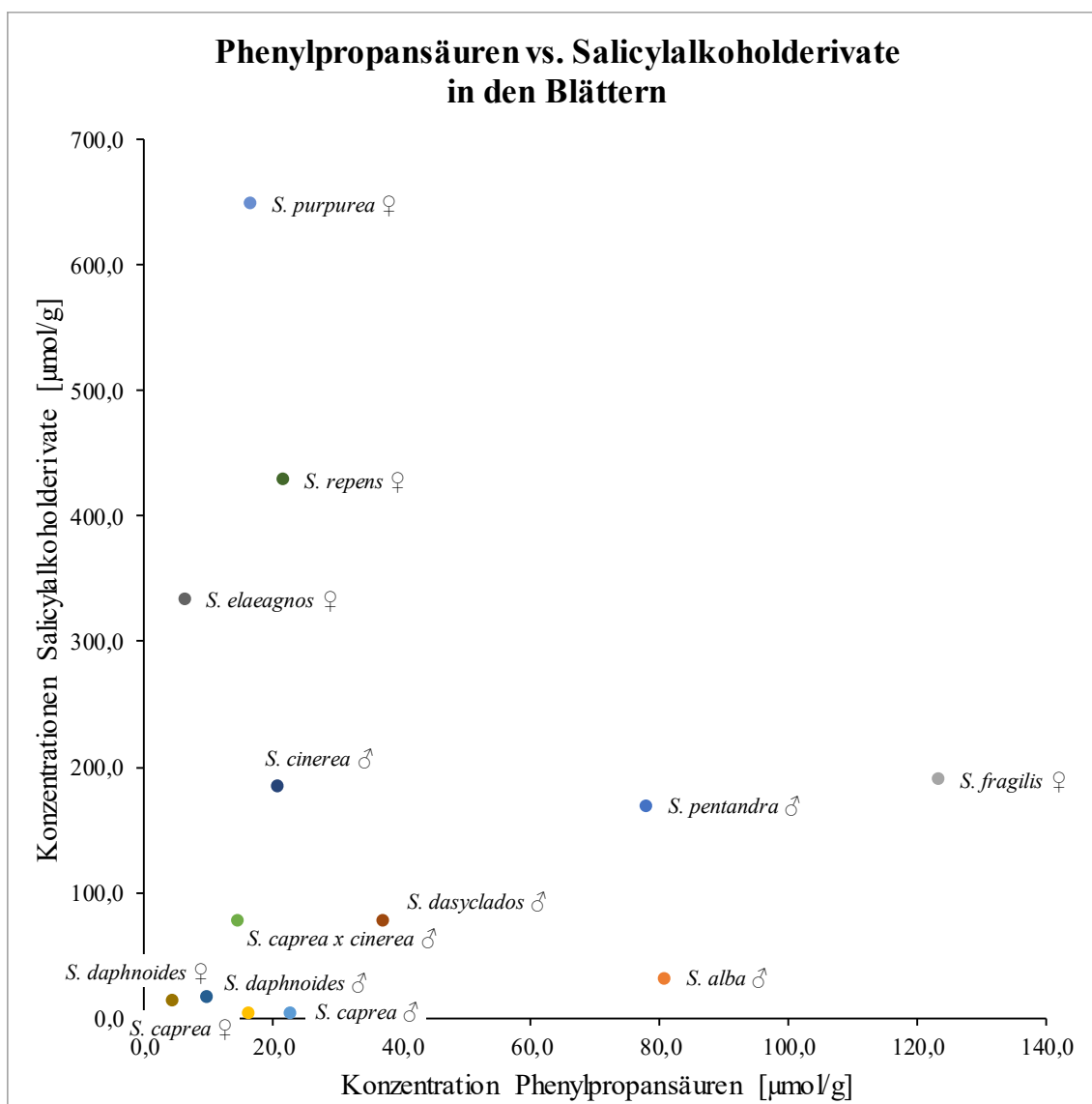


Abb. 6-45: Graphische Darstellung der Korrelation zwischen den Konzentrationen der Phenylpropansäuren und den Salicylkoholderivaten in den Blättern. In dieser Darstellung wurden die maximalen Werte für jede Probe berücksichtigt, die während der Wachstumsaison erreicht wurden. Die Konzentrationen sind in µmol Phenylpropansäuren, berechnet als Kaffeesäure, bzw. Salicylkoholderivate, berechnet als Salicin, je g Droge angegeben.

Auch in den Trieben stellt sich das gleiche Bild bei dieser Weide dar (Abb. 6-44). Generell ist bei allen anderen Spezies auch in den Trieben das Verhältnis in Richtung der PAs verschoben. Jedoch ist dies bei *S. pentandra*, *S. fragilis* und *S. cinerea* nicht so stark ausgeprägt. Damit scheint bei diesen dreien die Biosynthese der PAs in den Trieben im Verhältnis zu den Blättern gehemmt zu sein.

Weiter sollte auch die Korrelation zwischen Phenylpropansäuren und Salicylalkoholderivaten herausgearbeitet werden. Die Motivation für diese Betrachtung liegt darin begründet, dass die Phenylpropansäuren als Vorläuferverbindung für die Salicylalkohole erachtet werden (Babst et al., 2010; Boatright et al., 2004; Long et al., 2009; Orlova et al., 2006; Ruuhola und Julkunen-Tiitto, 2003; Zenk, 1967). Dazu sind in **Abb. 6-45** die entsprechenden Korrelationen in den Blättern gezeigt. Hier zeigen *S. pentandra*, *S. alba*, *S. fragilis* und *S. dasyclados* verhältnismäßig hohe Konzentrationen an Phenylpropansäuren, aber niedrige Gehalte an Salicylalkoholderivaten. Auffällig ist, dass somit die Vertreter des Subgenus *Salix* in dieser Betrachtung ähnliche Eigenschaften zeigen. Die beiden *S. daphnoides* und *S. caprea* Pärchen zeigten im gesamten Probensatz vergleichsweise geringe Konzentrationen an beiden Stoffgruppen. *S. caprea* x *cinerea*, *S. cinerea*, *S. elaeagnos*, *S. repens* und *S. purpurea* bewegen sich im selben niedrigen Konzentrationsbereich der Phenylpropansäuren, jedoch zeigen sich bei diesen deutlich erhöhte Salicylalkoholderivate in den Blättern.

In **Abb. 6-46** sind die Korrelationen der Phenylpropansäuren gegen die Salicylalkoholderivate in den Trieben gezeigt. *S. elaeagnos* zeigt als einzige Art keine nennenswerten Gehalte der Phenylpropansäuren in diesem Gewebe, zeichnet sich jedoch durch den höchsten detektierten Maximalwert bzgl. der Salicylalkohole in allen untersuchten Weiden aus. Im Falle der *S. repens* wurden in beiden Stoffgruppen hohe Werte gefunden. *S. dasyclados*, *S. fragilis* und *S. alba* weisen auch in den Trieben hohe Gehalte an Phenylpropansäuren und vergleichsweise geringe Konzentrationen der Salicylalkohole auf. *S. caprea* x *cinerea* ist die Spezies mit dem geringsten Salicylalkoholgehalt und führte zusätzlich nur geringe Mengen an Phenylpropansäuren. Alle weiteren Weiden formen eine Gruppe, die Konzentrations-verhältnisse zwischen den genannten Extremen aufweist. Innerhalb dieser konnte festgestellt werden, dass im Vergleich der Geschlechter sowohl bei *S. caprea* und *S. daphnoides* beim ♂ im Vergleich zum ♀ die Phenylpropansäuren vermindert und die Salicylalkoholderivate erhöht waren. Damit kann für männliche *Salix* Spezies eine erhöhte biosynthetische Leistung bzgl. letztgenannter Stoffgruppe postuliert werden, was mit einem verstärkten Abbau der Phenylpropansäuren korreliert zu sein scheint. Diese These muss allerdings noch durch weitere Beispiele untermauert werden. Der Hybrid *S. caprea* x *cinerea* zeigt gegenüber seinen Eltern eine deutliche verminderte Syntheseleistung der Salicylalkohole und akkumuliert ähnliche Mengen von Phenylpropansäuren wie *S. caprea* ♂.

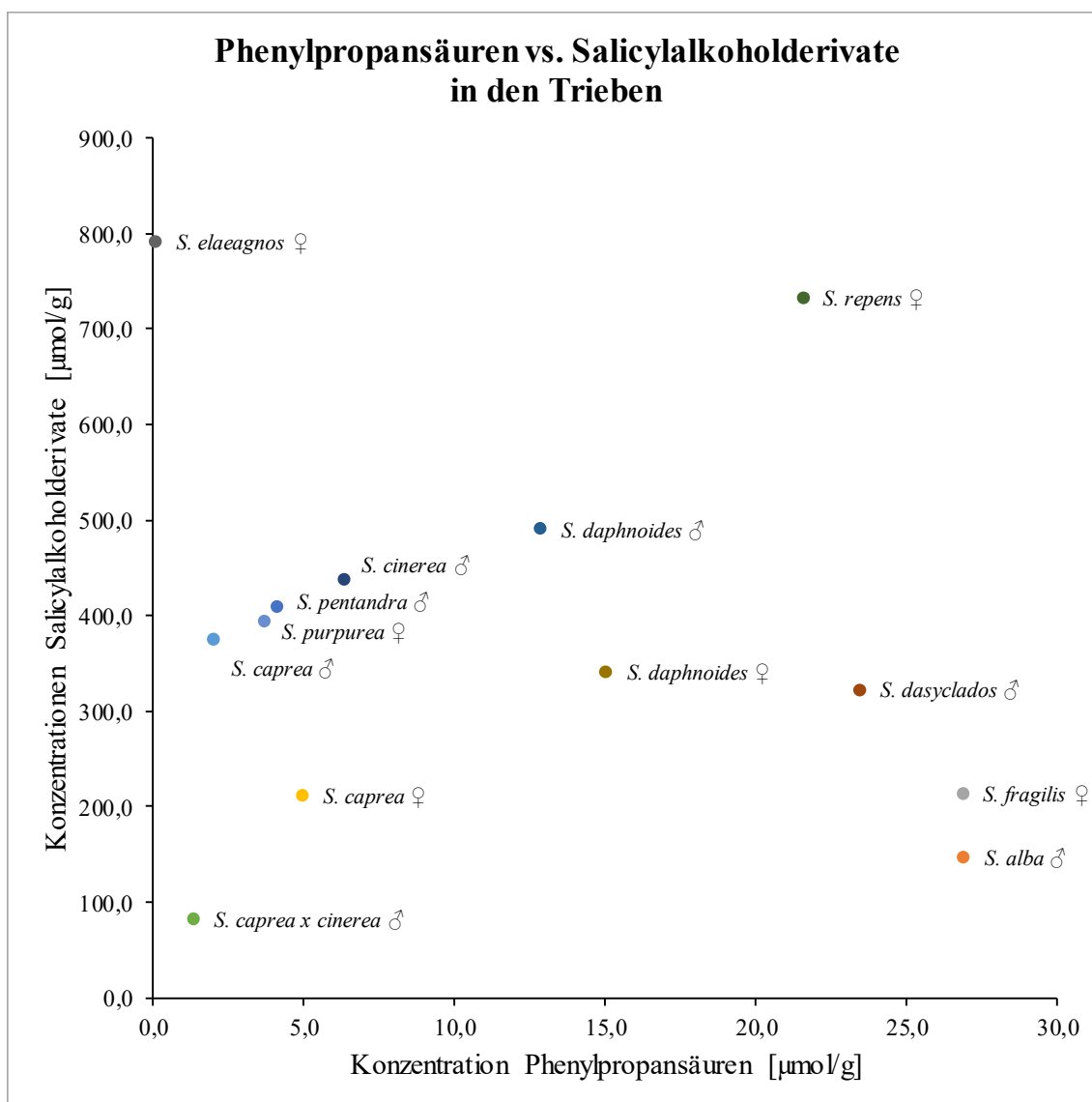


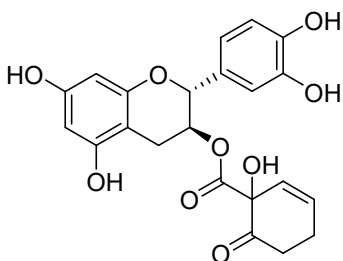
Abb. 6-46: Graphische Darstellung der Korrelation zwischen den Konzentrationen der Phenylpropansäuren und den Salicylalkoholderivaten in den Trieben. In dieser Darstellung wurden die maximalen Werte für jede Probe berücksichtigt, die während der Wachstumsaison erreicht wurden. Die Konzentrationen sind in μmol Phenylpropansäuren, berechnet als Kaffeesäure, bzw. Salicylalkoholderivate, berechnet als Salicin, je g Droge angegeben.

6.2.8 Qualitative Untersuchung in Bezug auf mögliche Markersubstanzen 6''-O-trans-p-Cumaroylisosalipurposid und Catechin-3-O-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure)-ester

Durch diese Untersuchungen sollte über ein ESI-HRMS-Experiment qualitativ nach den Verbindungen 6''-O-trans-p-Cumaroylisosalipurposid (Freischmidt et al., 2012; Freischmidt, 2011; Zapesochnaya et al., 2002) und dem Catechin-3-O-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure)-ester (siehe **Abb. 6-47**) (Jürgenliemk et al., 2007) gesucht werden. Erstere Verbindung wurde auch im Rahmen dieser Dissertation isoliert (vgl. Kapitel 3.3). In **Tabelle 6-7** sind die jeweiligen Treffer für diese beiden potentiellen chemotaxonomischen Marker in den Blättern und diesjährigen Trieben für alle Weiden aufgeführt. Untersucht wurden exemplarisch die Proben vom 01.08.2016, da dieser Probenzug vollständig war.

Tabelle 6-7: Aufstellung der Treffer für die für die jeweiligen gesuchten Verbindungen. Die Identifikation erfolgte im Rahmen einer UHPLC-ESI-HRMS/MS Untersuchung, wie in Kapitel 6.5.7 beschrieben.

	Catechin-3-O-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure)-ester		6''-O-trans-p-Cumaroylisosalipurposid	
	Blatt	Trieb	Blatt	Trieb
<i>S. pentandra</i>				
<i>S. alba</i>		X		
<i>S. fragilis</i>		X		
<i>S. caprea</i> ♀	X	X		
<i>S. caprea</i> ♂	X	X		
<i>S. cinerea</i>		X		
<i>S. caprea</i> x <i>cinerea</i>		X		
<i>S. dasyclados</i>				
<i>S. elaeagnos</i>	X	X		
<i>S. daphnoides</i> ♀				X
<i>S. daphnoides</i> ♂				X
<i>S. repens</i>	X	X		
<i>S. purpurea</i>		X		



Catechin-3-*O*-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure)-ester

Abb. 6-47: Struktur der aus *S. purpurea* isolierten Verbindung Catechin-*O*-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure)-ester (Jürgenliemk et al., 2007).

Vor allem sind hier die Resultate bzgl. des 6'-*O-trans-p*-Cumaroylisosalipurposid interessant. Dieses konnte im Rahmen dieser Untersuchung lediglich in beiden *S. daphnoides* Individuen detektiert werden. Da es bereits aus *S. purpurea* isoliert wurde (Freischmidt et al., 2012; Freischmidt, 2011), ist die Abwesenheit in dem hier eingeschlossenen Individuum erstaunlich. Vielleicht können auch Umweltfaktoren einen größeren Einfluss auf die Biosyntheseleistung haben.

Der Catechin-*O*-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure)-ester wurde in den Trieben aller Arten mit Ausnahme der *S. pentandra*, *S. dasyclados* und beider Geschlechter der *S. daphnoides* gefunden. In den Blättern wurde diese Substanz nur in *S. repens*, *S. elaeagnos* und beiden *S. caprea* Individuen registriert. Die Abwesenheit dieser Verbindung in *S. daphnoides* deckt sich mit den Ergebnissen des hier vorgestellten Flavan-3-ol-Isolierungsprojekt (vgl. Kapitel 3). In der hier vorliegenden Studie konnte dieser spezielle Ester des Catechins nicht isoliert werden. Da diese Verbindung in erstaunlich vielen Spezies identifiziert wurde, muss der Probenumfang unbedingt ausgeweitet werden, um Rückschlüsse auf eine mögliche chemotaxonomische Tauglichkeit ziehen zu können.

6.2.9 Vergleichende Bewertung der NMR-Fingerprints der Blätter

In diesem Projekt sollten die ^1H -NMR-Spektren der Blätter des Probenzugs vom 01.08.2017 auf mögliche Unterschiede im metabolischen Fingerprint untersucht werden. Dazu wurden die Proben mit $\text{DMSO-}d_6$ extrahiert, dem 0,03% TMS als interner Standard zugesetzt war. Grundlage für diese Herangehensweise lieferte eine Arbeit von Safer et al. (2011), die über ein solches Verfahren Korrelationen zwischen verschiedenen Edelweißarten herstellen konnten. Da diese Methode sehr schnell und einfach mit dem an der Universität Regensburg vorhandenen NMR-Spektrometern durchgeführt werden konnte, sollte diese Methodik für die Blätter evaluiert werden. Die Blätter sind für einen größeren Maßstab einer chemotaxonomischen Studie besonders geeignet, da diese sehr leicht geerntet und verarbeitet werden können.

In **Abb. 6-48 - 6-50** sind die ^1H -NMR-Spektren der Blätter aller untersuchten Weidenarten aufgeführt. In **Abb. 6-48** sind die Signale im Hochfeld (δ 0.00 – 4.00 ppm) herausgegriffen. Bei 0.00 ppm sind die Signale des internen Standards (TMS) und bei 2.50 ppm des Lösungsmittels (DMSO) zu finden. Qualitativ sind in diesem Bereich keine deutlichen Unterschiede auszumachen. Als interessante Bereiche konnten 3.26 – 3.53 ppm (1) und 3.84 – 3.92 ppm (2) ausgemacht werden. Der Signal-Cluster (1) war zwar in allen *Salix* Spezies zu finden, allerdings konnten für diesen bei genauerer Betrachtung unterschiedliche Formen festgestellt werden. Diese sind v.a. durch unterschiedliche chemischen Verschiebungen der höchsten Intensitäten gekennzeichnet, so dass drei „Unter-Cluster“ (1.1: 3.37 ppm, 1.2: 3.38 ppm, 1.3 3.40 ppm) gebildet wurden. Dieser Signalbereich dürfte für die Wasserstoff-Atome von Zuckern stehen. Daher ist eine unterschiedliche Zusammensetzung der Zucker in den verschiedenen Weiden wahrscheinlich. Es fällt auf, dass die Form von (1) zwischen den Geschlechtern (*S. daphnoides*, *S. caprea*) Kongruenz zeigt. Genauso verhält es sich bei den Vertretern der Sektion *Vetrix* (*S. caprea*, *S. cinerea*, und *S. caprea* x *cinerea*). Bei *S. purpurea* ist die Intensität von (1) im Verhältnis zu den anderen Signalen am schwächsten ausgeprägt. Interessant ist, dass innerhalb dieses Signal-Clusters unterschiedliche Lagen der Signalspitze festgestellt werden konnten. Folgende Arten zeigten das Maximum bei 3.37 ppm („Unter-Cluster“ 1.1): *S. pentandra*, *S. fragilis*, *S. caprea* ♀ & ♂, *S. cinerea*, *S. caprea* x *cinerea*. *S. repens* hatte das Maximum bei 3.38 ppm („Unter-Cluster“ 1.2) und folgende Weiden bei 3.40 ppm (Unter-Cluster 1.3): *S. alba*, *S. dasyclados*, *S. elaeagnos*, *S. daphnoides* ♀ & ♂ und *S. purpurea*. Das Signal (2) ist besonders gut bei *S. dasyclados*, *S. elaeagnos*, beiden *S. daphnoides* und *S. purpurea* zu erkennen. In diesen Proben könnte man dieses Signal als d bei 3.88 ppm ($J = 7.7$ Hz) postulieren. Diese fünf *Salix* Spezies zeigen auch bzgl. des Clusters (1) Übereinstimmung.

Wesentlich deutlichere Signale, die auch qualitativ nur in bestimmten Arten gefunden wurden zeigt der in **Abb. 6-49** extrahierte Ausschnitt. Diese Intervalle sollen besondere Erwähnung finden: 4.31 – 4.89 ppm (3), 4.92 – 5.04 ppm (4), 5.04 – 5.20 ppm (5), 5.23 ppm (d, $J = 9.1$ Hz) (6), 5.38 – 5.50 ppm (7), 5.50 – 5.93 ppm (8), 6.00 – 6.17 ppm (9), 6.17 – 6.27 ppm (10), 6.27 – 6.55 ppm (11), 6.55 – 6.94 ppm (12), 6.94 – 7.08 ppm (13), 7.08 – 7.39 ppm (14), 7.39 – 7.70 ppm (15) und 7.97 ppm (d, $J = 8.0$ Hz) (16). Der Bereich (3) konnte in allen Weiden außer den beiden *S. daphnoides* detektiert werden. Dieser Bereich kann in drei weitere Cluster untergliedert werden: 4.31 – 4.47 ppm (3.1), 4.47 – 4.68 ppm (3.2) und 4.75 – 4.89 ppm (3.3). Letzterer wurde auch bei *S. elaeagnos* gefunden, während die ersten beiden in dieser Art kaum zu erkennen waren. Der Cluster (4) konnte nur in *S. dasyclados* und *S. purpurea* identifiziert werden. Die Signalgruppe (5) wurde in weitere zwei Cluster aufgeteilt: 5.04 – 5.14 ppm (5.1) und 5.14 – 5.20 ppm (5.2). Während letztgenannter in allen Blättern vorhanden ist, zeigt sich der Erste lediglich in diesen Arten, bzw. Geschlechtern: *S. elaeagnos*, *S. daphnoides* und *S. purpurea*. Die Signale im Bereich (6) konnten nur bei *S. elaeagnos*, *S. repens* und *S. purpurea* detektiert werden. Die Signale im Intervall (7) sind in diesem Probenset sehr spezifisch für *S. purpurea*, da diese nur in dieser Spezies gefunden wurden. Der Bereich (8) konnte wieder genauer untergliedert werden: 5.50 – 5.71 ppm (8.1), 5.66 ppm (d, $J = 10.0$ Hz) (8.2), 5.74 ppm (d, $J = 9.8$ Hz) (8.3) und 5.87 – 5.93 ppm (8.4). Letzterer Cluster wurde in allen Arten außer *S. pentandra*, *S. fragilis* und *S. purpurea* gefunden. Der erstgenannte Cluster könnte ein guter Marker für die Sektion *Vetrix* sein, zumal dieser in allen entsprechenden Vertretern (*S. caprea*, *S. cinerea*, *S. caprea* x *cinerea*) detektiert werden konnte. Die beiden d wurden nur in den Blättern der *S. dasyclados*, *S. repens* und *S. purpurea* detektiert. Die Signalgruppe (9) konnte in den Arten *S. dasyclados*, *S. elaeagnos*, *S. repens* und *S. purpurea* ausgemacht werden. Das Intervall (10) beinhaltet zwei s bei 6.18 ppm (10.1) und 6.24 ppm (10.2), die beide nur in *S. alba* zu finden sind. Daher könnte es sich um ein Signal mit hoher taxonomischer Aussagekraft handeln. Der Bereich (11) gliedert sich in folgende Unterbereiche: 6.27 – 6.55 ppm (11.1), 6.35 ppm (d, $J = 1.6$ Hz) (11.2), 6.44 ppm (d, $J = 1.6$ Hz) (11.3), 6.46 ppm (d, $J = 1.9$ Hz) (11.4) und 6.39 – 6.55 ppm (11.5). Der erstgenannte Cluster ist ausschließlich bei *S. cinerea* zu finden, dagegen scheint der letztgenannte spezifisch für *S. elaeagnos* und *S. repens* zu sein. Ein d bei 6.35 ppm konnte nur bei den Individuen der *S. daphnoides* gefunden werden. Zusätzlich ist bei selbigen und bei *S. purpurea* ein weiteres d bei 6.44 ppm zu erkennen. Bei *S. cinerea*, *S. caprea* x *cinerea* und *S. dasyclados* konnte ein d bei 6.46 ppm detektiert werden. Dabei zeigte letztere die deutlichste Ausprägung dieses Signals. Im Intervall (12) waren sehr viele einzelne Signalgruppen auszumachen:

6.55 – 6.86 ppm (12.1), 6.75 ppm (d, $J = 8.4$ Hz) (12.2), 6.75 ppm (s) (12.3), 6.76 ppm (s) (12.4), 6.79 ppm (d, $J = 1.4$ Hz) (12.5), 6.83 ppm (s) (12.6), 6.89 ppm (s) (12.7), 6.9s ppm (s) (12.8). Das Cluster (12.1) wurde in allen Arten bis auf *S. pentandra*, *S. dasyclados* und *S. purpurea* gefunden. Das d (12.2) konnte nur in den Blättern der *S. fragilis* und *S. alba* identifiziert werden und könnte damit einen interessanten Marker für die Sektion *Salix* darstellen. Das s (12.3) wurde ausschließlich in *S. purpurea* registriert. Die Signale (12.4), (12.5) und (12.6) sind nur in den beiden *S. daphnoides* Individuen enthalten. Diese Kombination könnte aufgrund seiner Spezifität ein Charakteristikum für diese Spezies sein. Ebenso ist auch (12.7) bei diesen Vertretern vorhanden, wurde aber auch bei *S. purpurea* detektiert. Das Signal (12.8) trat lediglich bei *S. cinerea*, *S. caprea* x *cinerea* und *S. dasyclados* auf. Der Bereich (13) enthält einen Cluster von 6.94 – 7.08 ppm (13.1), der in allen Proben außer den vier aus der Sektion *Vetrix* und *S. pentandra* enthalten ist. Ein weiteres s bei 7.03 ppm (13.2) wurde nur in *S. alba* detektiert und könnte zu einer möglichen Markersubstanz gehören. Der Bereich (14) sollte auch wieder feiner unterteilt werden: 7.14 ppm (d, $J = 8.2$ Hz) (14.1), 7.19 ppm (s) (14.2), 7.24 ppm (d, $J = 7.7$ Hz) (14.3), 7.26 ppm (s) (14.4), 7.26 – 7.39 ppm (14.5). Die ersten drei Signale (14.1 – 14.3) wurden in *S. dasyclados*, *S. elaeagnos*, *S. repens* und *S. purpurea* detektiert, wobei das s bei 7.19 ppm (14.2) in *S. repens* und das d bei 7.24 ppm (14.3) in *S. dasyclados* fehlte. Das s bei 7.26 ppm (14.4) wurde in *S. fragilis*, *S. alba* und *S. cinerea* entdeckt. Der zuletzt aufgeführte Cluster (14.5) ist in *S. fragilis*, *S. alba*, *S. dasyclados*, *S. elaeagnos*, *S. repens* und *S. purpurea* zu finden. Das Intervall (15) ließ sich folgendermaßen untergliedern: 7.39 – 7.45 ppm (15.1), 7.45 ppm (s) (15.2), 7.45 – 7.48 ppm (15.3), 7.47 – 7.55 ppm (15.4), 7.55 – 7.61 ppm (15.5) und 7.61 – 7.70 ppm (15.6). Die Signalgruppe (15.1) ist in *S. dasyclados* und in beiden *S. daphnoides* enthalten. Das s (15.2) ist spezifisch für *S. alba*. Der Cluster (15.3) ist Bestandteil der Spektren der Vertreter der Sektion *Vetrix*, *S. dasyclados* und den beiden *S. daphnoides* Individuen. Bis auf bei den beiden *S. daphnoides* wurde bei diesen Weiden auch die Signalgruppe (15.5) identifiziert. Die Signale (15.4) wurden ausschließlich in den Blättern der *S. elaeagnos* und *S. purpurea* gefunden. Der Cluster (15.6) wurde exklusiv in denselben beiden Arten festgestellt. Genauso ist im Bereich (16) ein d bei 7.97 ppm ($J = 8.0$ Hz) in den Proben der *S. elaeagnos* und *S. purpurea* enthalten.

In **Abb. 6-50** ist der Ausschnitt von 8.20 – 13.80 ppm in den ^1H -NMR-Spektren gezeigt. Folgende Bereiche sollen diskutiert werden: 8.20 – 9.07 ppm (17), 9.15 – 9.63 ppm (18), 10.22 ppm (bs) (19), 12.04 ppm (bs) (20), 12.63 ppm (bs.) (21), 12.94 (bs) (22) und 13.01 (bs) (23). Der Bereich (17) soll noch weiter untergliedert werden: 8.20 – 8.28 ppm (17.1), 8.25 – 8.30 ppm (17.2), 8.30 – 8.37 ppm (17.3), 8.30 – 8.51 ppm (17.4), 8.41 ppm (17.5), 8.42 ppm

(17.6), 8.46 ppm (17.7), 8.48 – 9.07 ppm (17.8). Der Cluster (17.1) wurde ausschließlich in allen Vertretern der Sektion *Vetrix* gefunden. Die Signalgruppe (17.2) ist in den Spektren der *S. alba*, *S. dasyclados*, *S. elaeagnos*, *S. daphnoides* ♀ und *S. repens* enthalten. Da im Falle von *S. daphnoides* (17.2) lediglich im ♀ detektiert wurde, könnte es sich hier um einen hochinteressanten Geschlechtsspezifischen Marker handeln. Die Signale in dem Intervall (17.3) wurden nur in beiden *S. caprea*, *S. caprea* x *cinerea* und *S. elaeagnos* detektiert. Die Signale im Bereich (17.4) wurden in *S. fragilis*, *S. alba* und beiden *S. daphnoides* registriert. Das Signal (17.5) ist ein Alleinstellungsmerkmal für *S. cinerea*. Das Signal (17.6) stellte sich in diesem Probenaset als spezifisch für beide *S. caprea*, *S. caprea* x *cinerea* und *S. repens* heraus und wurde in beiden Individuen identifiziert. Das Signal (17.7) und der Cluster (17.8) wurden in allen Weiden gefunden, lediglich *S. pentandra* enthielt (17.7) nicht. Das Intervall (18) setzte sich aus drei Abschnitten zusammen: 9.15 – 9.24 ppm (18.1), 9.25 ppm (18.2) und 9.60 ppm (18.3). Der erstgenannte Bereich (18.1) wurde in den Weiden der Sektion *Vetrix* und in *S. repens* und *S. purpurea* detektiert. Die beiden weiteren Signale (18.2 und 18.3) sind in allen Spektren außer dem der *S. pentandra* enthalten. Das Signal (19) konnte in *S. alba*, *S. elaeagnos*, *S. purpurea* und beiden *S. daphnoides* nicht identifiziert werden. Dagegen zeichnete sich (20) als Alleinstellungsmerkmal von *S. purpurea* heraus. In *S. pentandra*, *S. alba*, beiden *S. caprea* und *S. repens* ist (21) enthalten. Das Signal (22) tritt in allen Spektren der Vertreter der Sektion *Vetrix* (*S. caprea*, *S. cinerea*, *S. caprea* x *cinerea*) und *S. dasyclados* auf. Das letzte Signal (23) konnte nur in den Blättern beider *S. daphnoides* Individuen und *S. purpurea* detektiert werden.

Diese Betrachtung konnte zeigen, dass *S. pentandra* die wenigsten Signale aufwies. Zwischen den Geschlechtern (*S. caprea* und *S. daphnoides*) konnten mit Ausnahme des Signals (17.2) bei *S. daphnoides* keine qualitativen Unterschiede gefunden werden. Viele Übereinstimmungen waren innerhalb der Sektionen *Salix* (*S. fragilis*, *S. alba*) und *Vetrix* (*S. caprea*, *S. cinerea*, *S. caprea* x *cinerea*) offensichtlich. Interessant ist die Betrachtung des Hybrids *S. caprea* x *cinerea* mit seinen Eltern. Dabei konnte eine größere qualitative Übereinstimmung mit *S. cinerea* gefunden werden. Lediglich im Cluster (17.3) zeigt *S. caprea* ihren alleinigen Einfluss. Auch hier muss festgestellt werden, dass wie bei den im Vorfeld vorgestellten Ergebnissen, beide Elternteile das Inhaltsstoffspektrum mit beeinflussten. Folgende Arten zeigten eine chemische Verschiebung, die nirgends anders detektiert wurde (in Klammern ist die jeweilige Anzahl solcher Signale aufgeführt): *S. alba* (4x), *S. cinerea* (2x), *S. daphnoides* ♀ & ♂ (4x), *S. repens* (1x) und *S. purpurea* (3x). In **Tabelle 6-8** sind alle vorgestellten Signale und ihr jeweiliges Vorkommen in den Blättern der jeweiligen Weiden zusammengefasst.

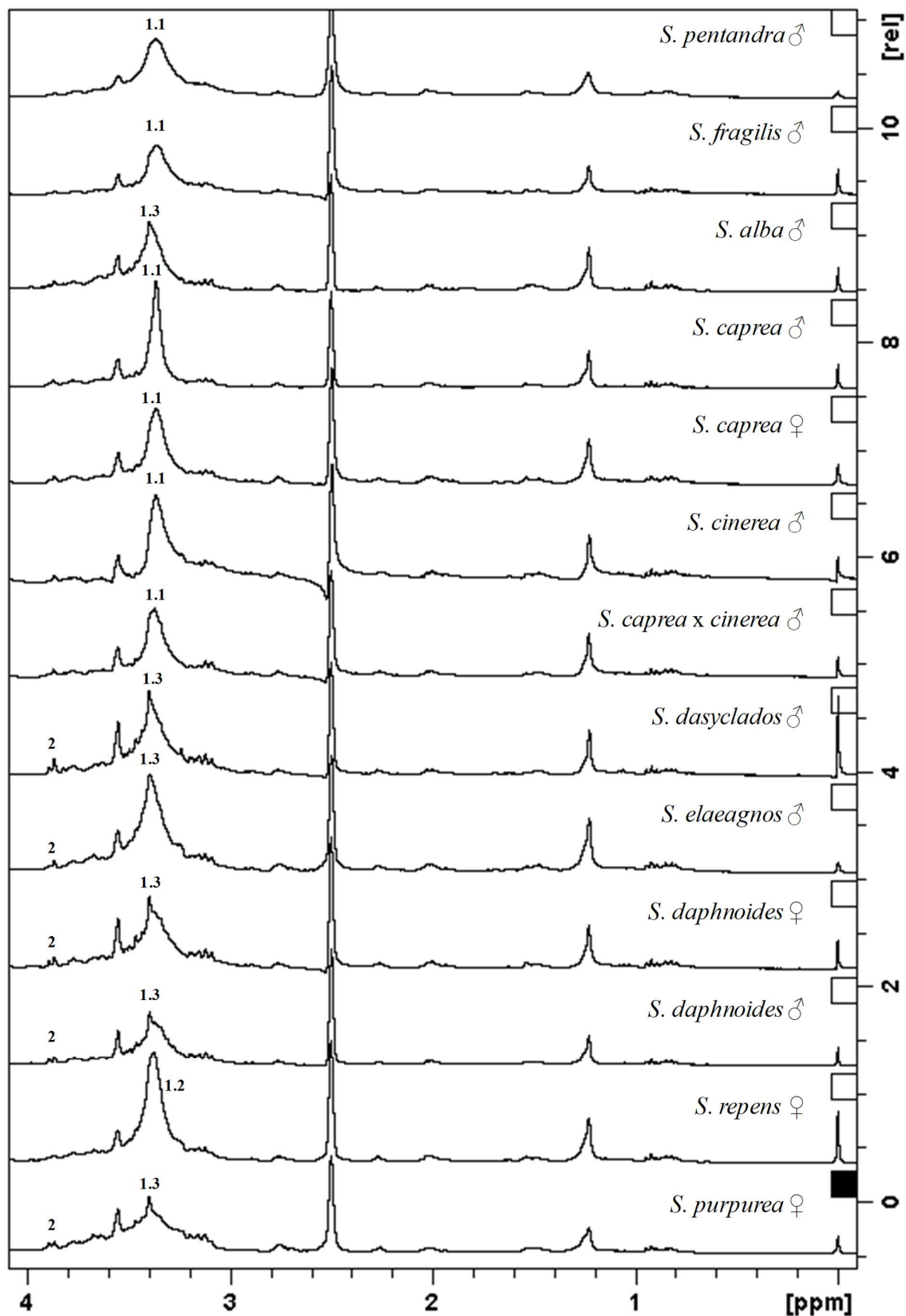


Abb. 6-48: ^1H -NMR Spektren der untersuchten *Salix* Spezies von $\delta 0.00 - 4.00$ ppm. Die Proben wurden bei RT mit einem AVANCE 300 NMR-Spektrometer bei 300.13 MHz (^1H -NMR, in $\text{DMSO}-d_6$ mit 0,03% TMS als interner Standard) vermessen.

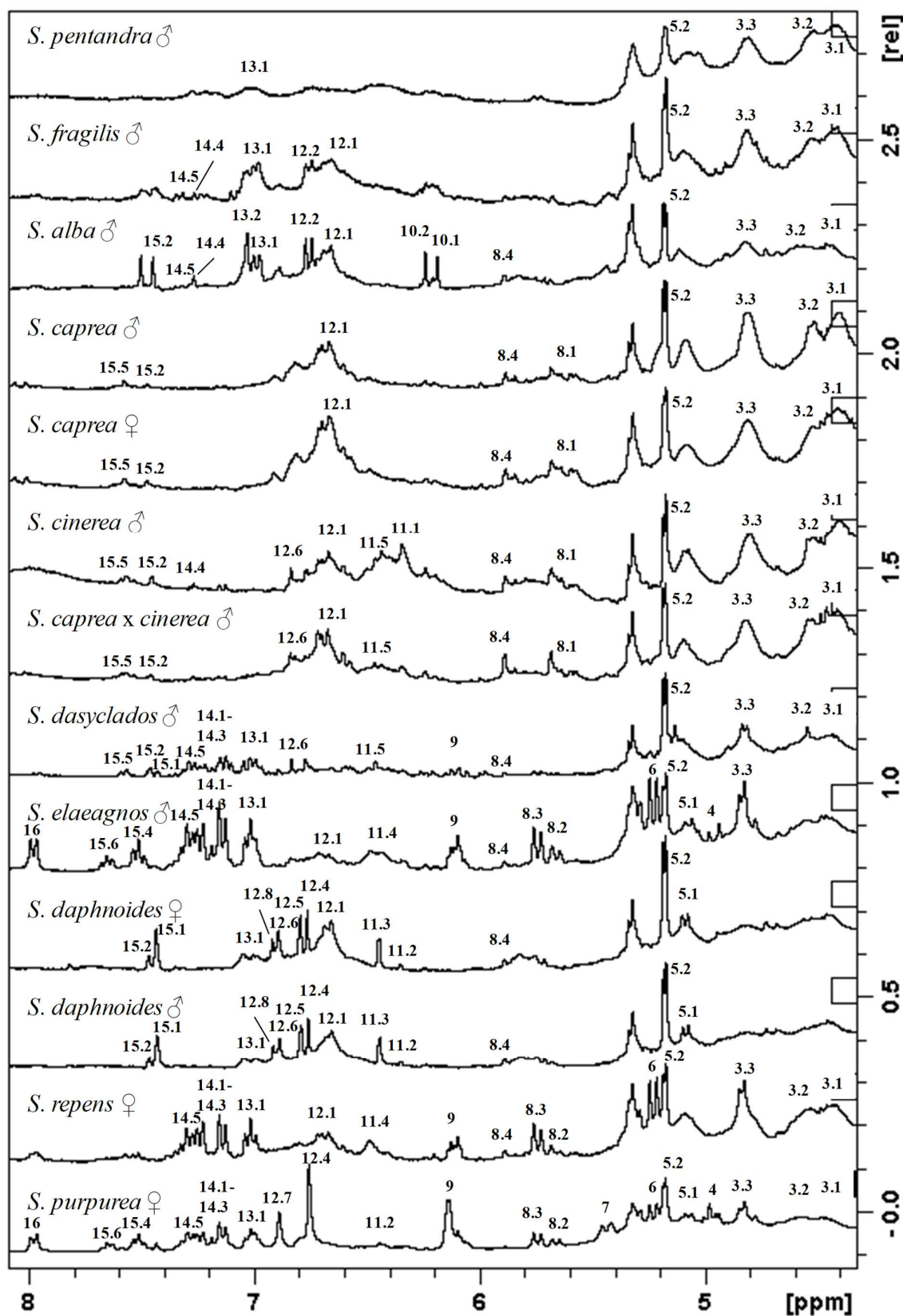


Abb. 6-49: ^1H -NMR Spektren der untersuchten *Salix* Spezies von $\delta 4.40 - 8.02$ ppm. Die Proben wurden bei RT mit einem AVANCE 300 NMR-Spektrometer bei 300.13 MHz (^1H -NMR, in $\text{DMSO}-d_6$ mit 0,03% TMS als interner Standard) vermessen.

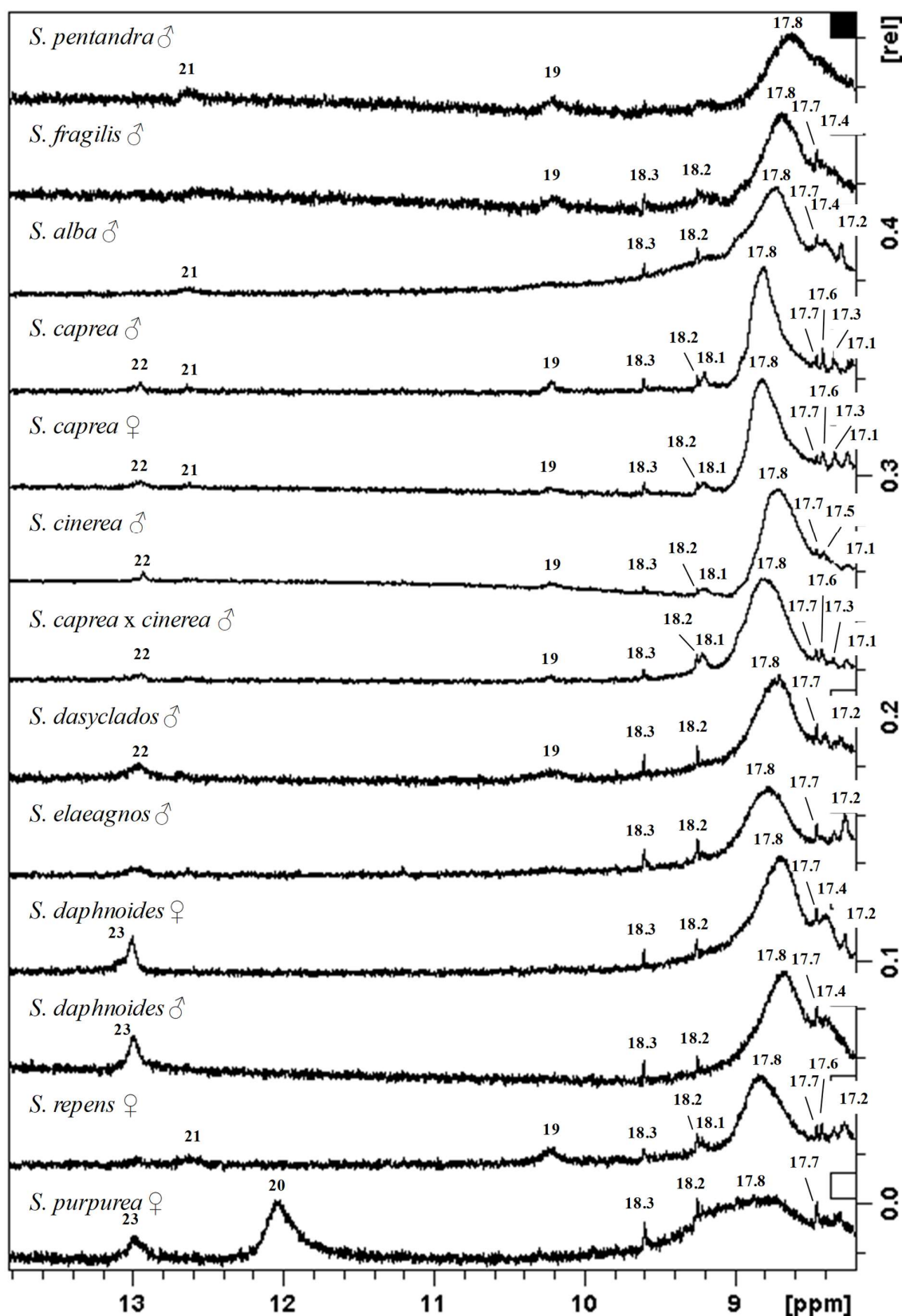


Abb. 6-50: ^1H -NMR Spektren der untersuchten *Salix* Spezies von δ 2.20 - 13.80 ppm. Die Proben wurden bei RT mit einem AVANCE 300 NMR-Spektrometer bei 300.13 MHz (^1H -NMR, in $\text{DMSO}-d_6$ mit 0,03% TMS als interner Standard) vermessen.

Tabelle 6-8: Gesamtübersicht über die detektierten Signale, bzw. Cluster in den ^1H -NMR-Spektren. Grüne Felder zeigen die Anwesenheit und rote die Abwesenheit eines Signals an.

δ_{H} , Signal oder Bereich (J in Hz)	Signalbezeichnung im Text	<i>S. pentandra</i> ♂	<i>S. fragilis</i> ♀	<i>S. alba</i> ♂	<i>S. caprea</i> ♀	<i>S. caprea</i> ♂	<i>S. cinerea</i> ♂	<i>S. caprea x cinerea</i> ♂	<i>S. dasyclados</i> ♂	<i>S. elaeagnos</i> ♀	<i>S. daphnoides</i> ♀	<i>S. daphnoides</i> ♂	<i>S. repens</i> ♀	<i>S. purpurea</i> ♀
3.37 (Siganlspitze)	1.1													
3.38 (Siganlspitze)	1.2													
3.40 (Siganlspitze)	1.3													
3.88, d (7.7)	2													
4.31 - 4.47	3.1													
4.47 - 4.68	3.2													
4.75 - 4.89	3.3													
4.92 - 5.04	4													
5.04 - 5.14	5.1													
5.14 - 5.20	5.2													
5.23, d (9.2)	6													
5.38 - 5.50	7													
5.50 - 5.71	8.1													
5.66, d (10.0)	8.2													
5.74, d (9.8)	8.3													
5.87 - 5.93	8.4													
6.00 - 6.17	9													
6.18, s	10.1													
6.24, s	10.2													
6.27 - 6.55	11.1													
6.35, d (1.6)	11.2													
6.44, d (1.6)	11.3													
6.46, d (1.9)	11.4													
6.39 - 6.55	11.5													
6.55 - 6.86	12.1													
6.75, d (8.4)	12.2													
6.75, s	12.3													
6.76, s	12.4													
6.79, d (1.4)	12.5													
6.83, s	12.6													
6.89, s	12.7													
6.92, s	12.8													
6.94 - 7.08	13.1													
7.03, s	13.2													
7.14, d (8.2)	14.1													
7.19, s	14.2													
7.24, d (7.7)	14.3													
7.26, s	14.4													
7.26 - 7.39	14.5													
7.39 - 7.45	15.1													
7.45, s	15.2													
7.45 - 7.48	15.3													
7.47 - 7.55	15.4													
7.55 - 7.61	15.5													
7.61 - 7.70	15.6													
7.97, d (8.0)	16													
8.20 - 8.28	17.1													
8.25 - 8.30	17.2													
8.30 - 8.37	17.3													
8.30 - 8.51	17.4													
8.41	17.5													
8.42	17.6													
8.46	17.7													
8.48 - 9.07	17.8													
9.15 - 9.24	18.1													
9.25	18.2													
9.60	18.3													
10.22, bs	19													
12.04, bs	20													
12.63, bs	21													
12.94, bs	22													
13.01, bs	23													

Diese Resultate zeigen, dass die Untersuchung des Metaboloms in Weiden durch Interpretierung der ^1H -NMR-Spektren ein gutes Werkzeug sein könnte. Jedoch ist eine Auswertung und Vergleich der Spektren über die einzelnen Signale sehr mühsam, fehleranfällig und lässt einen gewissen Ermessensspielraum in der Datenerhebung zu. Somit ist es wahrscheinlich, dass Datensätze erhoben werden würden, die in einer schlechten Vergleichbarkeit resultieren. Um gerade bei einer Ausweitung dieses Projekts die Daten standardisiert aufzubereiten und statistisch zu vergleichen soll hier ein Verfahren vorgestellt werden, dass sich zur vergleichenden Bewertung einer Hauptkomponentenanalyse bedient. Dazu wurden die Spektren einer Bucket-Integration unterzogen. Das bedeutet, dass in starren 0.04 ppm Intervallen die Spektren von -0.02 - 14.02 ppm integriert wurden. Zur einheitlichen Kalibrierung wurde DMSO- d_6 verwendet, dem bereits durch den Hersteller 0,03% TMS als interner Standard zugesetzt wurde. Somit war eine einheitliche Kalibrierung des TMS-Signals und Integration der Buckets möglich. Um Unterschiede in den Einwaagen des Drogenmaterials zu egalisieren, wurde für jedes Bucket die Anzahl Hs je g Drogenmaterial berechnet. Um mögliche Messschwankungen auszugleichen, wurde für jede Weide im Triplikat gemessen und für jedes Bucket der Mittelwert berechnet. Wie die obigen Ausführungen zeigten scheint der Bereich von ca. 4.00 – 8.20 ppm die größte Aussagekraft bzgl. der Taxonomie zu haben. Daher wurden die Buckets von 3.98 ppm (Bucket-Nr. 254) bis 8.22 ppm (Bucket-Nr. 149) für die Hauptkomponentenanalyse herangezogen. Bei diesem statistischen Verfahren werden aus den gemessenen Ausgangsdaten neue sogenannte latente Variablen errechnet. Diese latenten Variablen werden als Hauptkomponenten bezeichnet (Kessler, 2008b). Somit ist eine Dimensionsreduktion eines sehr komplexen Datensatzes möglich. Je nach Anteil an der Gesamtvarianz können für die graphische Darstellung die Verwendung von zwei (2D-Darstellung) oder drei (3D-Darstellung) Hauptkomponenten sinnvoll sein. Die statistische Berechnung und Erstellung der Graphiken wurde unter zu Hilfenahme des Statistikprogramms R-Studio (Version 1.0.143) und R (Version 3.4.0) durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Verfahrens zu diesen Proben sind in **Abb. 6-51** (2D-Darstellung) und **Abb. 6-52** (3D-Darstellung) dargestellt. Vorteile dieser Methodik sind die einfache Erfassung großer Datenmengen, die gute Interpretierbarkeit der Graphiken und neben einer qualitativen auch eine quantitative Erfassung, da auch die Integrale herangezogen werden können.

Dieses Verfahren zeigt ebenfalls nur geringfügige Unterschiede zwischen den Geschlechtern (*S. caprea*, *S. daphnoides*). Auch kann eine gewisse Gruppierung der Vertreter der Sektion *Vetrix* v.a. in der 3D Betrachtung festgestellt werden. Hier sind alle vier Individuen unterhalb der PC 1 x PC 2 Fläche zu finden (hier steht PC für Hauptkomponente). Erstaunlich ist, dass diese Ergebnisse mehr Einfluss der *S. caprea* auf den Hybriden indizieren als *S. cinerea*. Bei der rein qualitativen Betrachtung der Signale stellte es sich anders herum dar. Diese Umkehrung könnte auf die Erfassung der Integrale zurückzuführen sein. Besonders isoliert in den Graphiken stachen *S. purpurea* und *S. elaeagnos* heraus. Unter Verwendung der in dieser Studie einbezogenen Weiden kann ein erfolgreicher Einsatz dieser Methodik als wahrscheinlich angesehen werden. Um tatsächlich verlässliche chemotaxonomische Aussagen über dieses Verfahren treffen zu können, ist eine Ausweitung der Stichproben unbedingt erforderlich. So müssen vor allem mehrere Individuen der gleichen Art einbezogen werden. Ebenso müssen auch Einflüsse verschiedener Standorte in Betracht gezogen werden, um verlässliche Aussagen treffen zu können.

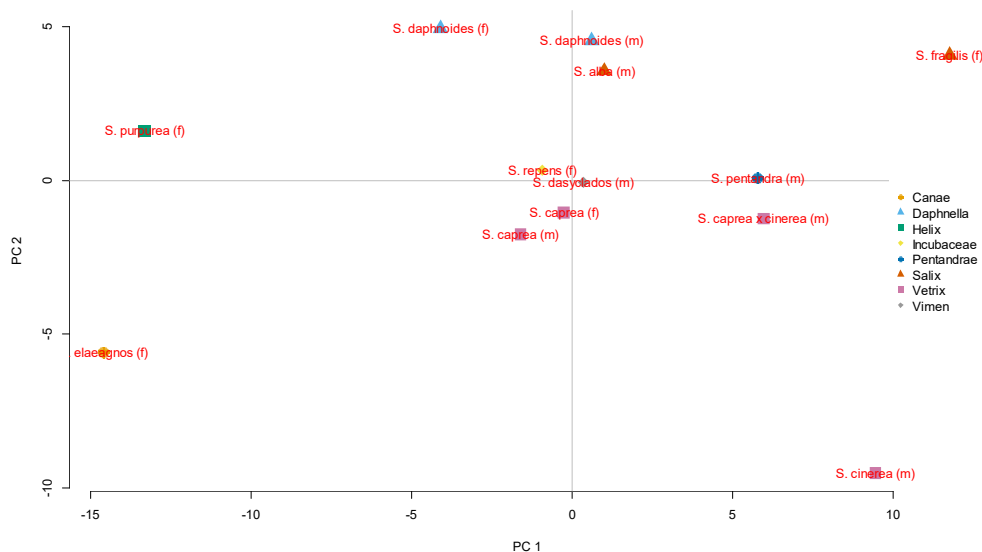


Abb. 6-51: 2D-Plot der Hauptkomponentenanalyse der ^1H -NMR-Spektren von δ 3.98 - 8.22 ppm. Die Hauptkomponente PC 1 beschreibt 55,73% und PC 2 16,13% der Gesamtvariation. Die Geschlechter sind hier durch m (male) und f (female) kenntlich gemacht.

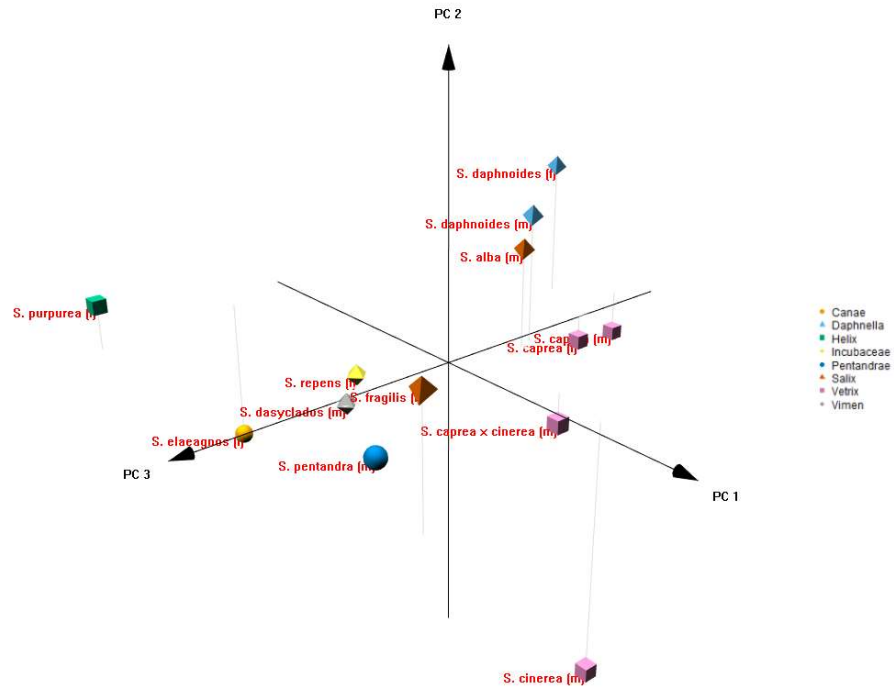


Abb. 6-52: 3D-Plot der Hauptkomponentenanalyse der ^1H -NMR-Spektren von δ 3.98 - 8.22 ppm. Die Hauptkomponente PC 1 beschreibt 55,73%, PC 2 16,13% und PC 3 12,24% der Gesamtvariation. Die Geschlechter sind hier durch m (male) und f (female) kenntlich gemacht.

6.3 Diskussion

6.3.1 Flavan-3-ole unter besonderer Berücksichtigung der Proanthocyanidine

In Bezug auf die PA-Gehalte wurden einige interspezifische Unterschiede, aber auch einige allgemeine Gemeinsamkeiten festgestellt. Alle Weiden zeigten große saisonale Schwankungen der PA-Gehalte in den Blättern und diesjährigen Trieben. Die Maximalwerte in den Blättern wurden speziesspezifisch während der gesamten Wachstumssaison in unterschiedlichen Monaten beobachtet, während in den diesjährigen Trieben die höchsten Konzentrationen im Juni oder August erreicht wurden. Die große saisonale Schwankungsbreite könnte eine Erklärung dafür sein, dass Poblocka-Olech und Krauze-Baranowska (2008) nicht in der Lage waren PC B2 in *S. daphnoides* via einer HPTLC-Methode zu identifizieren, während die Isolierung aus selbiger Art in der vorliegenden Arbeit gelang (vgl. Kapitel 3.2.3). Geht es um maximale Ausbeuten an Flavan-3-olen, so scheinen nach diesen Ergebnissen besonders die Sommermonate (Juni bis August) als idealer Erntezeitpunkt des Materials zur Gewinnung der Droge *Salicis cortex*. Dagegen waren die Anteile oligomerer PAs im Verhältnis zu den Gesamt-PAs (oligomere und polymere PAs) in Blättern und Trieben mit wenigen Ausnahmen recht ähnlich und während des Beobachtungszeitraums ziemlich konstant. Das bedeutet, dass steigende bzw. sinkende Gehalte oligomerer PAs in der Regel auch mit steigenden bzw. sinkenden Konzentrationen polymerer PAs verknüpft scheinen. Dieser Trend zeigte sich besonders bei den Vertretern des Subgenus *Salix* (*S. pentandra*, *S. alba*, *S. fragilis*), die alle die polymere Fraktion favorisierten. Bemerkenswert ist auch das Vorkommen PA armer Weiden, wie *S. pentandra* und *S. purpurea*, und PA reicher Weiden, wie *S. alba*, *S. caprea* und *S. daphnoides*, die bis zu zehnfach größere PA-Gehalte zeigten. Innerhalb der oligomeren PAs waren die kürzer kettigen (DP 2 & DP 3) in allen untersuchten Spezies während der gesamten Wachstumssaison klar begünstigt. Diese Ergebnisse decken sich auch mit Resultaten von Esatbeyoglu et al. (2010), welche nennenswerte Konzentrationen an PCs mit DP 2 (PC B1, B3 und B6) in der Rinde und den Blättern einer *S. alba* detektieren konnten. Die Untersuchungen in verschiedenen Pflanzenteilen innerhalb der gleichen Species zeigte nicht nur verschiedenen Gehalte an oligomeren und polymeren PAs auf, sondern auch saisonale Variation und qualitative Unterschiede. Diese wurden besonders bei der Quantifizierung der monomeren Flavan-3-ole (Catechin & Epicatechin) offensichtlich. In den diesjährigen Trieben aller untersuchten Weiden wurde Catechin akkumuliert, während Epicatechin dort nur in Spuren gefunden werden konnte. In den Blättern scheint die Einlagerung beider Epimere möglich, variiert allerdings je nach Art. In Bezug auf die Epicatechin-Konzentrationen in den Blättern zeigten alle einbezogenen Weiden einen charakteristischen Einbruch von August bis

September, mit der Ausnahme von *S. cinerea*, die hier in den Blättern einen leichten Anstieg aufwies.

Die Analysen weiblicher und männlicher Individuen der *S. daphnoides* und *S. caprea* lieferte keine einheitlichen oder hervorstechenden Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Gesamt-PA-Gehalt, saisonaler Konzentrationsverlauf des PA-Gehalts und die Verteilung zwischen diesjährigen Trieben und Blättern sowie die prozentuale Gewichtung der oligomeren PAs im Verhältnis zu den Gesamt-PAs zeigen leichte Unterschiede, unterstreichen jedoch eher die Gemeinsamkeiten. Allerdings war es Nybakken und Julkunen-Tiitto (2013) möglich, Unterschiede zwischen den Geschlechtern der *Salix myrsinifolia* SALISB. zu zeigen. Daher müssen noch weitere Geschlechterpärchen beprobt werden, um verlässliche und allgemeingültige Regeln abzuleiten. Sollte dazu das Clustern der PAs nach deren DP sich als nicht ausreichend herausstellen, muss über weitere analytische Methoden nachgedacht werden. So könnten datenbankgestützte UPLC®-MS/MS Methodiken herangezogen werden, um mögliche geschlechtsspezifische Markersubstanzen innerhalb der PAs zu finden.

Wie bereits eingangs gezeigt, konnten in verschiedenen Studien Einflüsse einer Hybridisierung auf das phenolische Inhaltsstoffspektrum nachgewiesen werden (Hallgren et al., 2003; Oberprieler et al., 2013; Orians et al., 2000; Orians und Fritz, 1995). Dabei konnten beispielsweise Oberprieler und Mitarbeiter (2013) zeigen, dass beide Eltern Einflüsse auf den Hybriden im phenolischen Inhaltsstoffspektrum haben. Dieses Ergebnis ist deckungsgleich mit der vorliegenden Studie, da auch hier beide Eltern die Zusammensetzung der phenolischen Sekundärmetabolite bei der untersuchten *S. caprea* x *cinerea* beeinflussen. Die diesjährigen Triebe führten ebenso wie *S. cinerea* nur niedrige Konzentrationen oligomerer PAs. Jedoch waren in diesem Organ auch die polymeren PAs verhältnismäßig gering konzentriert, und können daher eher mit dem Muster von *S. caprea* in Verbindung gebracht werden. Die Hybridisierung scheint auch zu einer Verringerung des Gesamt-PA-Gehalts in den Trieben zu führen, von der allerdings die monomeren Flavan-3-ole Catechin und Epicatechin nicht betroffen sind. Diese Beobachtung könnte ein interessanter Hinweis auf eine verringerte Aktivität der Dihydroflavonol-Reduktase in den Trieben sein. Dies muss allerdings auf der biosynthetischen Ebene noch genauer untersucht werden. Da Sekundärmetabolite physiologische und ökologische Funktionen unterstützen sollen, wie Schutz vor Herbivoren oder pathogenen Erregern, oder Vorteile in der Reproduktion durch das Anlocken von Bestäubern sowie Samenverbreitern über Blütendüfte oder Blütenfarben liefern (Wink, 1988), kann angenommen werden, dass der Hybrid im Gegensatz zu seinen Eltern abweichende Strategien etabliert, um mit seiner Umgebung zu interagieren (Orians, 2000).

6.3.2 Salicylalkoholderivate

Interessant ist bei der Betrachtung der Salicylalkoholderivate, dass sich im Vergleich der Geschlechter sowohl beim *S. daphnoides* als auch beim *S. caprea* Pärchen in Bezug auf die erreichten Maximalkonzentrationen der gleiche Trend abbildet. So zeigte in den Trieben in beiden Fällen das ♂ deutlich höhere Gehalte, während in allen vier Individuen in den Blättern vergleichbare, aber sehr niedrige Konzentrationen detektiert wurden ($< 20 \mu\text{mol/g}$). Mit Ausnahme der *S. purpurea* wurden von allen Arten die Triebe im Verhältnis zu den Blättern als Ablageort präferiert. Das ist ein Ergebnis, welches sich teilweise mit dem von Thieme (1965c) deckt. Dieser untersuchte nicht Gesamtkonzentrationen, sondern detektierte die ihm bekannten Einzelverbindungen. Betrachtet man die von ihm erstellten Jahresverläufe des Salicins, so decken sich diese mit den hier gezeigten Ergebnissen. Für das Salicortin stellte sich in Thiemes Arbeit (1965c) ein gegensätzliches Bild dar. Dieser differenzierte Datenabgleich kann zum einen durch die unterschiedlichen Detektions- und Quantifizierungsmethoden begründet sein. Zum anderen ist es auch wahrscheinlich, dass unterschiedliche Umweltfaktoren Einfluss auf die Biosynthese haben. Bzgl. der untersuchten Blätter in *S. pentandra* und *S. purpurea* zeigten die Resultate von Thieme (1965c) in beiden Fällen zunächst einen Anstieg von April bis Mai, gefolgt von einem kontinuierlichen Rückgang der Gehalte bis zum Ende des Beobachtungszeitraums. Diese Beobachtung konnte in diesen Spezies auch im Rahmen der vorliegenden Studie festgestellt werden. In den weiteren untersuchten Arten verhielt sich der Verlauf jedoch durchaus unterschiedlich. So zeigten *S. alba*, *S. caprea* und *S. daphnoides* in den Blättern sehr niedrige Gehalte, die nicht weiter betrachtet werden sollen. *S. fragilis* und *S. repens* folgten zunächst dem eben diskutierten Trend, zeichneten sich jedoch durch einen merklichen Anstieg der Konzentrationen zwischen August und September aus. *S. elaeagnos* wies recht geringe Schwankungen auf, während alle anderen Arten einen Anstieg während des Projektes zeigten.

Bei der Betrachtung der diesjährigen Triebe können die Untersuchungen der Rinden zum Abgleich der Daten herangezogen werden, zumal auch diese zur Gewinnung der Droge *Salicis cortex* herangezogen werden dürfen (Weidenrinde, 2015; Meier und Meier-Liebi, 2007). Im Rahmen der Untersuchungen von Thieme (1965c) wurde ab Februar/März (Maximalkonzentrationen) ein Abfall der phenolischen Glykoside bis ca. September (*S. alba*), August (*S. cinerea*) bzw. Oktober (*S. purpurea*), gefolgt von einem kontinuierlichen Anstieg bis zum Ende des Beobachtungszeitraums festgestellt. Diese Daten konnten durch Förster et al. (2008) bestätigt werden, die den Beobachtungszeitraum von März bis Juli wählten und über dieses Zeitintervall ebenso wie Thieme (1965c) abfallende Konzentrationen in den Rinden von *S. purpurea*,

S. daphnoides und *S. pentandra* detektierten. Anders stellte es sich allerdings bei Untersuchungen von Meier und Mitarbeitern (1985a) dar. Diese arbeiteten besonders die Salicylalkoholkonzentrationen in den Rinden von *S. purpurea* und *S. daphnoides* im Jahresverlauf heraus, da die Autoren zu dem Schluss kamen, dass dieses Salicylalkoholderivat als Hauptverbindung dieser Klasse maßgeblich den saisonalen Trend definiert. Diese Arbeitsgruppe detektierte die höchsten Gehalte in den Sommermonaten (Juli bis September). Als Erklärungsversuch führten die Autoren gerade im Vergleich zu den von Thieme (1965c) publizierten Daten das unterschiedliche voralpine Klima an, das in deren Untersuchungsarealen herrscht. In der vorliegenden Studie wichen auch die Werte der *S. cinerea* von den Literaturdaten (Thieme, 1965c) ab, da ein kontinuierlicher Anstieg von Juni bis August, gefolgt von einem leichten Rückgang beobachtet werden konnte. Vergleicht man diesen Verlauf mit dem von Thieme (1965c) publizierten Daten, so kann postuliert werden, dass das hier untersuchte Individuum im Jahresverlauf ca. zwei Monate voraus war. In dem hier betrachteten Zeitintervall zeigte *S. alba* über den gesamten Verlauf kontinuierlich steigende Werte, ein Resultat welches im Widerspruch zu den Untersuchungen von Thieme (1965c) steht. Bei *S. pentandra* decken sich die Ergebnisse mit abfallenden Gehalten bis Juli mit denen von Förster (2008). Da der Beobachtungszeitraum hier weiter gefasst war, konnte in der Folge ein deutlicher Anstieg mit einem Maximum im August detektiert werden. Der hier erarbeitete Verlauf der Konzentrationen der Triebe der *S. purpurea* decken sich mit keiner der vorgestellten Studien (Förster et al., 2008; Meier et al., 1985a; Thieme, 1965c), da hier eine stetige Zunahme des Gehalts registriert wurde. Diese Tatsache kann höchstens mit der generellen Aussage von Meier und Mitarbeitern (1985a) in Einklang gebracht werden, dass nach deren Untersuchungen die Konzentrationsspitzen zwischen Juli und September beobachtet werden konnten. Im Falle des vorliegenden Individuums wurde die Maximalkonzentration im September detektiert. Beide *S. daphnoides* Individuen zeigen in den Trieben einen ähnlichen Verlauf mit einem Maximum im August. Damit stellte sich der Vergleich mit den genannten Autoren wie bei der *S. purpurea* dar, in tendentieller Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Meier und Mitarbeitern (1985a). *S. fragilis* zeigt im Unterschied zu allen anderen Arten recht konstante Werte in den untersuchten Trieben. *S. dasyclados* zeigt über den gesamten Zeitraum zunehmende Gehalte. Bei allen anderen ist ähnlich den beiden *S. daphnoides* Individuen ein Anstieg bis August, gefolgt von einem Abfall bis September zu erkennen. Eine weitere Ausnahme stellte der Hybrid *S. caprea* x *cinerea* dar. Bewegte sich dieser bei allen anderen Parametern zwischen den beiden Elternarten, so zeigt er bei den Konzentrationen der Salicylalkoholderivate in den Trieben deutlich suppressierte Werte sowohl im Vergleich zu *S. caprea*, als auch zu *S. cinerea*.

Betrachtet man die in den verschiedenen Arten doch recht unterschiedlichen Verläufe der Salicylalkoholderivate gepaart mit den nur teils übereinstimmenden bzw. verschobenen Jahresverläufen, stellt sich eine chemotaxonomische Zuordnung über die Gesamtkonzentration oder auch anhand der Gehalte einzelner Salicylalkohole als nicht realisierbar dar. So müsste entweder ein relatives Konzentrationsverhältnis, oder die qualitative Zusammensetzung dieser Substanzklasse als Kriterium herangezogen werden. Auch diese Strategie müsste durch weitere Untersuchungen bewiesen werden. Der fehlende Nachweis möglicher Markersubstanzen kann, gerade unter dem Aspekt schwankender klimatischen Bedingungen, darauf zurückgeführt werden, dass eine Probe zu einem nicht aussagekräftigen Zeitpunkt im saisonalen Verlauf gezogen wurde. Aus diesem Grund muss auch die chemotaxonomische Aussagekraft bisher publizierter Arbeiten in Frage gestellt werden, die sich nur auf einen sehr begrenzten Zeitraum, oder gar nur einen Tag des Probenzugs beschränkt hatten (z.B.: Julkunen-Tiitto, 1989b, 1986, 1985a). Zusammenfassend bedeutet dies, dass man die Proben in einem vergleichbaren Entwicklungsstadium der Weiden generieren muss. Jedenfalls scheint nach den vorliegenden Ergebnissen zu den Jahresverläufen und den bisher beschriebenen (Förster et al., 2008; Meier et al., 1985a; Thieme, 1965c) eine Übertragbarkeit der Resultate auf Folgejahre, oder gar Individuen in anderen Klimazonen eher schwierig zu sein. Aus diesem Grund sind weitere und detailliertere Untersuchungen zur chemotaxonomischen Aussagekraft der Salicylalkoholderivate unter Berücksichtigung des Entwicklungsstatus der jeweiligen Weiden unbedingt erforderlich. Die Vorhersage eines optimalen Erntezeitpunkts gestaltet sich nach der Sachlage in Zusammenhang mit den Literaturdaten ebenfalls als schwierig. Aus pharmazeutischer Sicht können die höchsten Ausbeuten an Salicylalkoholen zur Gewinnung der Droge *Salicis cortex* bei einer Ernte zwischen Juli und September erwartet werden.

6.3.3 Phenylpropansäuren

Betrachtet man die Verteilung der Phenylpropansäuren zwischen Blättern und Trieben, konnte eine starke Präferenz für die Blätter als Akkumulierungsort festgestellt werden. Lediglich beide *S. daphnoides* Individuen bilden dabei eine Ausnahme, da sie die diesjährigen Triebe bevorzugten. Bei *S. caprea* ♀ und *S. repens* kam es am Ende des Beobachtungszeitraums zu einem Wechsel zugunsten der Triebe. Im Falle der *S. caprea*-Individuen zeigten sich recht ähnliche Konzentrationsverläufe, so dass hier keine Differenzierung zwischen den Geschlechtern getroffen werden konnte. Im Falle der *S. daphnoides* zeigten beide Geschlechter eine ansteigende Tendenz in den Blättern, die beim ♂ bis einschließlich September anhielt. Beim ♀ hingegen konnte dieser Trend lediglich bis August beobachtet werden, der von einer abfallenden Tendenz bis zum September gefolgt wurde. So könnte eine Differenzierung anhand dieser Jahresverläufe zwischen den Geschlechtern der *S. daphnoides* möglich sein. Diese These muss aber unbedingt durch eine Erhöhung der Stichprobenzahl überprüft werden. Innerhalb der Sektion *Vetrix* konnte für alle untersuchten Vertreter ein vergleichbares Profil festgestellt werden. Nur bei dem Hybriden *S. caprea* x *cinerea* stellte eine Konzentrationsspitze in den Blättern im August eine Ausnahme dar. Somit kann auch innerhalb dieser systematischen Gruppe eine gewisse Ähnlichkeit in der Biosyntheseleistung für diese Stoffgruppe unterstellt werden. Innerhalb des Subgenus *Salix* konnte eine deutliche Gemeinsamkeit festgestellt werden. So wurden innerhalb dieser Gruppe die höchsten Maximalgehalte ($\geq 77,9 \mu\text{mol/g}$) in den Blättern detektiert. *S. alba* und *S. fragilis* stellen zudem die Vertreter mit den größten Maximalwerten in den Trieben mit $26,9 \mu\text{mol/g}$, respektive $26,8 \mu\text{mol/g}$, im gesamten Probenset dar. Da diese beiden auch zur gleichen Sektion *Salix* (Skvortsov und Zinovjev, 1999) gehören, sind diese Resultate hochinteressante Übereinstimmungen. Damit wäre zum einen eine Zuordnung zum Subgenus *Salix* über die sehr hohen Werte in den Blättern denkbar, und weiter eine Differenzierung zur Sektion *Salix* über die zusätzlich in den Trieben amplifizierte Gehalte. Die Verläufe der *S. elaeagnos* erinnern an die der *S. caprea*, allerdings mit niedrigeren detektierten Werten. Die Art *S. dasyclados* zeigte ebenfalls recht hohe Maximalwerte in Blättern ($37,0 \mu\text{mol/g}$) und den Trieben ($23,4 \mu\text{mol/g}$) erreicht aber nicht die bereits diskutierten Konzentrationen der *S. pentandra* in den Blättern und *S. alba* und *S. fragilis* in Blättern und Trieben. Damit konnten einige Indizien gefunden werden, die eine chemotaxonomische Differenzierung über diese Inhaltsstoffgruppe möglich erscheinen lassen. Allerdings müssen endgültige Beweise über eine Erhöhung der Stichprobenzahl für die entsprechenden Individuen erbracht werden.

6.3.4 Flavanone und Flavonoide / Chalkone

In der Arbeit von Meier und Mitarbeitern (1985a) folgten die Kurvenverläufe der einzelnen Flavanone in beiden untersuchten Spezies (*S. purpurea* und *S. daphnoides*) jeweils demselben Trend. Dies kann in dieser Stoffgruppe auch als Legitimation für die Aufsummierung der Konzentrationen angesehen werden, um die biosynthetische Leistung im Jahresverlauf zu bewerten. Über den gesamten Probensatz hinweg konnte gezeigt werden, dass der bevorzugte Ablageort für die Flavanone die Triebe sind. Lediglich bei *S. dasyclados*, *S. elaeagnos* und *S. purpurea* waren die Verhältnisse zugunsten der Blätter vertauscht. Bzgl. dieser Stoffgruppe sind die Ergebnisse nicht mit denen von Meier et al. (1985a) in Einklang zu bringen. Im Fall der *S. daphnoides* zeigten diese recht konstante Werte von Juni bis August gefolgt von einem Abfall der Konzentrationen. In der vorliegenden Studie wurden dagegen in den Trieben ansteigende Werte bis August detektiert, die bis September auf einem konstanten Niveau stagnierten. Aufgrund von mikrobiellem Befall fehlt in diesem Probensatz leider der Messwert für die *S. purpurea* im Juli. Meier und Mitarbeiter (1985a) verzeichneten bei dieser Weide schwankende Werte, beginnend mit einem hohen Wert im Juni und endend mit einem Rückgang zwischen August und September. In diesem Projekt wurde zunächst ein Anstieg der Gehalte von Juni bis August registriert, gefolgt von einem Abfall der Konzentrationskurve. Ein deutlicher Unterschied zu den Literaturwerten (Meier et al., 1985a), war die Beobachtung, dass sich *S. purpurea* in diesem Probensatz durch um ein Vielfaches erhöhte Flavanonkonzentrationen auszeichnete, während Meier und Mitarbeiter für beide Arten einen ähnlichen Konzentrationsbereich bestimmt haben. Bei der Betrachtung der Vertreter des Subgenus *Salix* zeigten *S. pentandra* und *S. alba* keine nennenswerten Gehalte in den Blättern. *S. fragilis* hingegen beginnt in diesem Gewebetyp mit einer hohen Akkumulation, gefolgt von einem kontinuierlichen Rückgang der Konzentrationen während der Wachstumsperiode. Weitere Gemeinsamkeiten in den Trieben der Arten *S. alba* und *S. fragilis* sind das gemeinsame Maximum für die Akkumulation in der Mitte der Saison, mit einem vorher ansteigenden und anschließend abfallenden Verlauf. Innerhalb der Sektion *Vetrix* waren alle Trends ähnlich. Nur bei der Betrachtung der erreichten Gehalte musste bei dem Hybrid *S. caprea* x *cinerea* eine deutliche supprimierte Biosyntheseleistung in den diesjährigen Trieben gegenüber seiner „Eltern“ festgestellt werden. Beim Vergleich der Geschlechter war im Gegensatz zum *S. caprea* Pärchen ein leichter Unterschied bei *S. daphnoides* auszumachen. Bei letzterer wurden in den Blättern des ♂ von Juni bis September Flavanone detektiert, während dies beim ♀ nur im Mai der Fall war. In den Trieben zeigten beide den gleichen Verlauf mit einem sprunghaften Anstieg zum August, jedoch erreichte hier

das ♂ die höheren Werte. *S. repens* konnte über den gesamten Beobachtungszeitraum nur geringe Mengen in beiden Geweben akkumulieren.

In der Sammelgruppe „Flavonoide / Chalkone“ zeichneten sich beide *S. daphnoides* in dem hier untersuchten Probenstet durch die mit Abstand höchsten Gehalte in den Blättern aus ($\geq 100 \mu\text{mol/g}$). *S. purpurea* und *S. daphnoides* zeigten in der Arbeit von Meier und Mitarbeitern (1985a) bzgl. des Isosalipurposids in dem mit der vorliegenden Arbeit korrespondierenden Zeitintervall ein einheitliches Bild. So wurde dort von Juni bis Juli ein rascher Anstieg verzeichnet, gefolgt von einem Konzentrationsabfall bis September. Im Vergleich dazu wurden in der vorliegenden Arbeit in den diesjährigen Trieben beider *S. daphnoides* Individuen eine kontinuierliche abfallende Tendenz beobachtet, während die Gehalte in der *S. purpurea* über den Beobachtungszeitraum recht konstant blieben. Zwischen den Geschlechtern waren weder bei diesen, noch bei dem *S. caprea* Pärchen erwähnenswerte Unterschiede auszumachen. Im Gegensatz zu *S. caprea* wurden in *S. cinerea* keine nennenswerten Konzentrationen in den Trieben registriert. Da in den Trieben des Hybrids keine Substanzen dieser Gruppe festgestellt wurden, kann hier eine starke Beeinflussung durch *S. cinerea* unterstellt werden. Die Verläufe aller weiteren Arten zeigten noch keine Tendenzen, die Rückschlüsse auf systematische Zusammenhänge zulassen. Besonders interessant waren die Ergebnisse der UHPLC-ESI-MS/MS-Untersuchungen bzgl. des 6‘-*O-trans-p*-Cumaroylisosalipurposids (Freischmidt et al., 2012; Freischmidt, 2011; Zapesochayaya et al., 2002). Im vorliegenden Probenstet konnte diese Verbindung lediglich in den diesjährigen Trieben beider Geschlechter der *S. daphnoides* gefunden werden. Da diese potentielle Markersubstanz bereits aus *S. purpurea* isoliert wurde (Freischmidt et al., 2012; Freischmidt, 2011), ist es verwunderlich, dass die Detektion in dem hier untersuchten Individuum nicht gelang. Eine Ursache für diesen Befund könnten evtl. Einflüsse des Standorts und der Umweltbedingungen sein, die sich auf die biosynthetischen Vorgänge niederschlagen. Jedenfalls stellt diese Substanz auch weiterhin einen interessanten Marker dar, der auf jeden Fall noch detaillierter evaluiert werden muss. Um die Aussagekraft dieser gesamten Stoffgruppe abschließend für Weiden beurteilen zu können, ist ebenfalls eine Ausweitung des Probenpools unerlässlich.

6.3.5 Inhaltsgruppenübergreifende Betrachtungen

In **Abb. 6-53** sind die Biosyntheseschritte in der Flavonoid- und PA-Biosynthese aus der Veröffentlichung von Winkel-Shirley (2001) herausgegriffen. Diese Darstellung soll die Zusammenhänge für die Betrachtungen in Kapitel **6.2.7** besser erläutern. Nach bestem Wissen wurde in Bezug auf die hier eingeschlossenen Weiden in dieser Arbeit das erste Mal versucht, Zusammenhänge dieser Art herzustellen. Zusätzlich wurden auch biosynthetische Zusammenhänge zwischen Phenylpropansäuren und Salicylalkoholderivaten untersucht. Ein weiterer Ansatzpunkt war die Gegenüberstellung der Flavan-3-ole und Salicylalkohole, da diese beiden Stoffgruppen die größten Konzentrationsintervalle in den untersuchten Arten abbildeten. Für alle diese Gegenüberstellungen wurden jeweils die detektierten Maximalwerte herangezogen. Die Begründung dafür ist, dass somit idealerweise jedes Individuum zu einem optimalen Entwicklungsstadium innerhalb des Untersuchungszeitraums verglichen werden kann. Die Ergebnisse wurden in dem genannten Kapitel **6.2.7** herausgearbeitet, allerdings können diese Resultate nur Indizien für mögliche biosynthetische Zusammenhänge liefern. So ist eine Erhöhung des Stichprobenumfangs für validere Aussagen unbedingt erforderlich. Ein weiterer interessanter Ansatzpunkt könnte die Ermittlung der Expression der relevanten Enzyme in den entsprechenden Weiden sein, um evtl. über diesen Weg diese Befunde zu untermauern und detailliertere Informationen über mögliche Unterschiede zu gewinnen.

Weiter sollte eine Methode zur Untersuchung des Gesamtmetaboloms via ^1H -NMR exemplarisch mit den Blättern versucht werden. Dabei war interessant zu sehen, dass sich innerhalb des Subgenus *Salix S. alba* von den anderen beiden Vertretern abzuheben scheint. Interessant war auch, dass diese Untersuchungen eine größere Ähnlichkeit des Hybriden zu *S. caprea* x *cinerea* zu *S. caprea* indizierte als zu *S. cinerea*. Zwischen den Geschlechtern zeigte sich jeweils in beiden untersuchten Beispielen große Übereinstimmung. Verfahren via NMR wurden bereits an anderen Pflanzen erfolgreich erprobt (Bilia et al., 2001; Holmes et al., 2006; Safer et al., 2011) und stellt eine interessante, schnelle und einfach durchzuführende Methodik zur Erfassung des Metaboloms in pflanzlichem Material dar. Ebenso wurde eine Auswertung und statistischer Vergleich der ^1H -NMR-Daten unter Verwendung einer Hauptkomponentenanalyse vorgestellt. Die Ergebnisse daraus müssen jedoch mit äußerster Vorsicht genossen werden, da auch in diesem Fall eine Erhöhung der Stichprobenzahl unerlässlich ist. So muss für diese Herangehensweise unbedingt überprüft werden, ob innerhalb einer Art alle Individuen in sich einen reproduzierbaren Cluster bilden, ehe verwandtschaftliche Beziehungen zu anderen Species auf einem soliden Fundament diskutiert werden können.

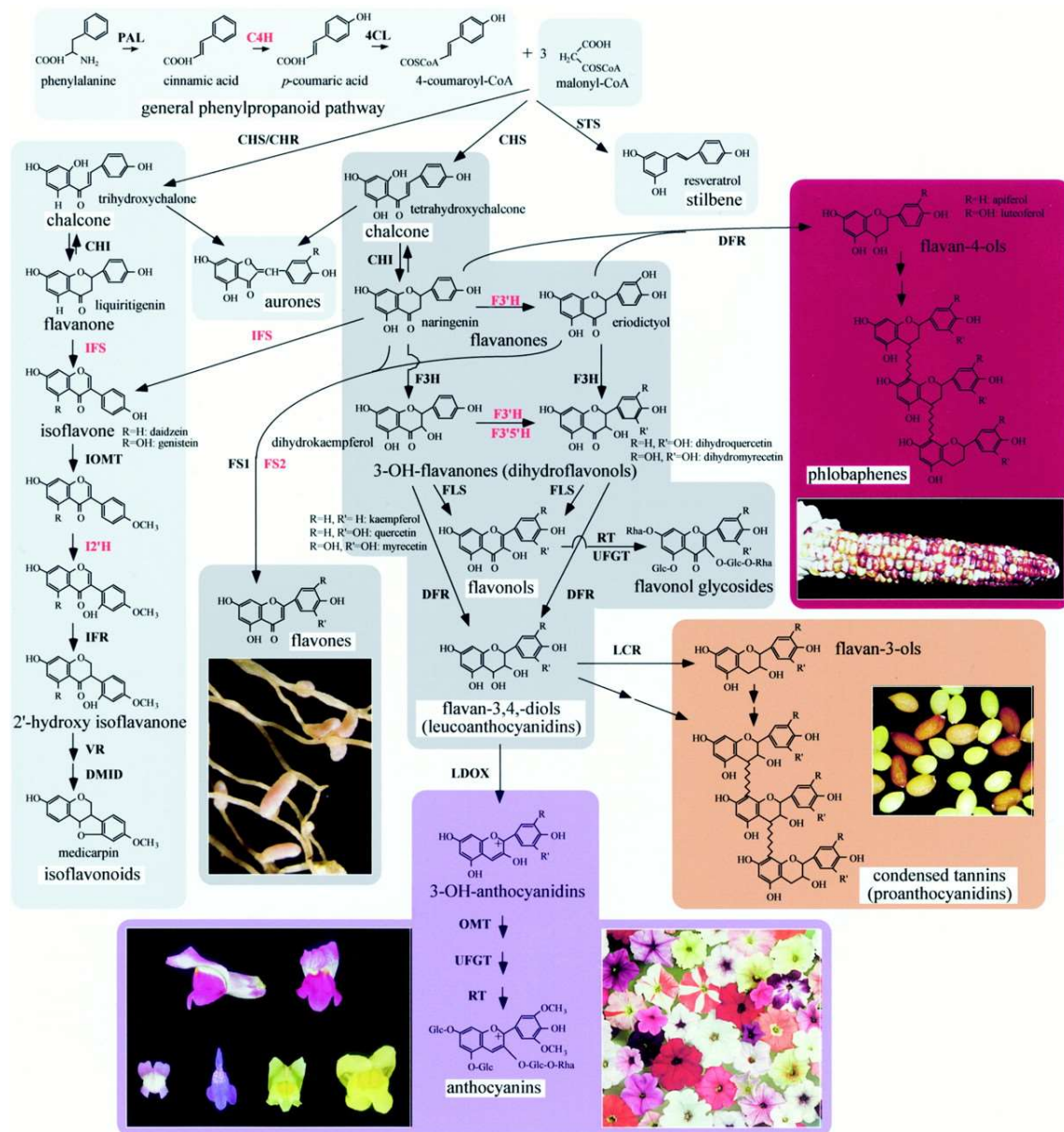


Abb. 6-53: Schematischer Überblick zu den Biosynthesewege der Flavonoide von Winkel-Shirley (2001). Diese Ausführungen lieferten die Grundlage für die stoffgruppen-übergreifenden Betrachtungen bzgl. möglicher unterschiedlicher biosynthetischer Leistung in den untersuchten Weiden (vgl. Kapitel 6.2.7). Abkürzungen: CHS = Chalkonsynthase, C4H = Cinnamat-4-hydroxylase, CHI = Chalkonisomerase, CHR = Chalkonreduktase, 4CL = 4-Cumaroyl:CoA-ligase, DFR = Dihydroflavonol-4-reduktase, DMID = 7,2'-Dihydroxy, 4'-Methoxyisoflavanoldehydratase, F3H = Flavanon-3-hydroxylase, FS1 & FS2 = Flavonsynthase 1 & 2, F3'H = Flavanoid-3'-hydroxylase, F3'5'H = Flavonoid-3'5'-hydroxylase, IOMT = Isoflavon-*O*-methyltransferase, IFR = Isoflavonreduktase, I2'H = Isoflavon-2'-hydroxylase, IFS = Isoflavonsynthase, LDOX = Leucoanthocyanidin-dioxygenase, LCR = Leucoanthocyanidinreduktase, OMT = *O*-Methyltransferase, PAL = Phenylalaninammoniumlyase, RT = Rhamnosyltransferase, STS = Stilbensynthase, UFGT = UDPG-Flavonoidglucosyltransferase, VR = Vestitonreduktase.

6.4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Pilotstudie wurden die Blätter und diesjährigen Triebe von 13 Weidenarten untersucht. Dabei wurden die Konzentrationsverläufe der für diese Gattung relevanten Stoffgruppen über eine Wachstumsperiode (Mai bis September) ermittelt. Die Zuordnung der detektierten Peaks zu den jeweiligen Stoffklassen erfolgte über die entsprechenden UV-Maxima. Dabei wurden die Gehalte der Salicylalkoholderivate, Flavan-3-ole, Flavanone, Phenylpropan-säuren und Flavonoide und Chalkone aus einem UPLC®-RP-18-Chromatogramm extrahiert und als jeweilige Modellsubstanzen berechnet. Außerdem wurden die monomeren Flavan-3-ole Catechin und Epicatechin gesondert in den Chromatogrammen erfasst. Die PAs sollten besonders berücksichtigt werden. Dazu wurde eine von Hellenbrand und Mitarbeitern (2015b) entwickelte UPLC®-DIOL-Methode auf die vorliegende Problemstellung übertragen und etabliert. Somit konnten die PAs nach ihren DPs aufgetrennt und als Cluster differenziert detektiert und quantifiziert werden. Dieses Vorgehen ermöglichte eine vergleichende Betrachtung der PA-Muster. Weiter wurde auf die beiden Verbindungen 6“-*O-trans-p*-Cumaroylisosalipurposid (Freischmidt et al., 2012; Freischmidt, 2011; Zapesochnaya et al., 2002) und Catechin-3-*O*-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure)-ester (Jürgenliemk et al., 2007) im Rahmen einer UHPLC-ESI-HRMS/MS-Untersuchung in einem vollständigen Probenst (01.08.2016) in Blättern und diesjährigen Trieben gescreent. Abschließend sollte eine Methode zum Vergleich des Metaboloms via ¹H-NMR auf die Blätter desselben Probenst angewendet und evaluiert werden.

Besonders interessant war das Profil des untersuchten Hybriden *S. caprea* x *cinerea*, welches von beiden Ausgangspflanzen beeinflusst zu sein schien. Zwischen den Geschlechtern, untersucht an *S. caprea* und *S. daphnoides*, konnten keine herausstechenden Unterschiede detektiert werden. Lediglich in der Untersuchung des Metaboloms via ¹H-NMR konnte im Falle der *S. daphnoides* beim ♀ ein Signal detektiert werden, welches beim ♂ fehlte. Gerade in Bezug auf die PA-Muster hoben sich die drei Vertreter des Subgenus *Salix* (*S. pentandra*, *S. fragilis*, *S. alba*) durch eine höhere Gewichtung der polymeren PAs von den übrigen untersuchten Weiden ab. Ansonsten waren sehr deutliche interindividuelle Unterschiede in allen Arten zu sehen. Auch scheint der Ansatz über NMR deswegen hoch interessant, da darüber sehr schnell Datensätze zu einem statistischen Vergleich im Zuge einer Hauptkomponentenanalyse gewonnen werden konnten. Jedoch sind zu diesem Zeitpunkt des Erkenntnisstandes keineswegs verlässliche Aussagen bzgl. chemotaxonomischer Zusammenhänge möglich. Ermutigende Indizien für taxonomische Rückschlüsse im Genus *Salix* stellt die Gewichtung der polymeren PAs zu den Gesamt-PAs zur Differenzierung des Subgenus *Salix* dar. Weiter scheinen die via UHPLC-ESI-

HRMS/MS gesuchten Verbindungen 6“-*O-trans-p*-Cumaroylisosalipurposid und Catechin-3-*O*-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure)-ester durchaus potentielle chemotaxonomische Marker zu sein. So ermutigen die gewonnenen Resultate zu einer Fortsetzung und Ausweitung dieses Projekts. Es müssen jedoch unbedingt weitere Individuen der gleichen Spezies und weitere Arten beprobt werden. Ebenso ist eine Beobachtung der Jahresverläufe über mehrere Jahre unabdingbar, um festzustellen, ob die Biosynthese innerhalb einer Wachstumsperiode auch unter sich von Jahr zu Jahr ändernden klimatischen Bedingungen konstant ist. Um diese Fragestellungen in Folgeprojekten aufzuarbeiten, scheinen die dazu in diesem Pilotprojekt etablierten Methoden geeignet. Schließlich ist eine Erhöhung der Stichproben zur Beurteilung signifikanter Unterschiede für den Vergleich gewisser Gruppen unbedingt erforderlich.

6.5 Experimenteller Teil

6.5.1 Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland): (+)-Catechin Hydrat $\geq 98\%$, 5,7-Dimethoxycoumarin 98% (= Citropten), DMSO- d_6 mit 0,03% TMS [V/V].

Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland): Folin-Ciocalteu Reagenz, Kaffeesäure Reag. DAB, MeOH für die Flüssigchromatographie, MeCN für die Flüssigchromatographie.

Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland): Na_2CO_3 anh., D-(-)-Salicin $\geq 98\%$, Ameisensäure p. a., Silica Gel Orange (= Orangelgel).

Alfa Aesar (Thermo Fisher GmbH, Karlsruhe, Deutschland): Quercetin Dihydrat 97%, 3',5,7-Trihydroxy-4'-methoxyflavanone 97% (Hesperetin).

Phytolab GmbH & Co. KG (Vestenbergsgreuth, Deutschland): (-)-Epicatechin $\geq 95\%$.

Forschungsinstitut für Leder und Kunststoffbahnen GmbH (Freiberg, Deutschland): Freiberg Hautpulver.

Das H_2O für die Analysen wurde durch eine Astacus Filteranlage der Firma MembraPure GmbH (Henningsdorf/Berlin, Deutschland) aufbereitet.

6.5.2 Pflanzenmaterial

Folgende Individuen wurden aus dem Ökologisch-Botanischen Garten der Universität Bayreuth beprobt: *Salix pentandra* L. ♂, *S. alba* L. ♂, *S. fragilis* L. ♀, *S. caprea* L. ♂ & ♀, *S. cinerea* L. ♂, *S. caprea* x *cinerea* ♂, *S. daphnoides* VILL. ♂ & ♀, *S. purpurea* L. ♀, *S. dasyclados* WIMM. ♂, *S. elaeagnos* SCOP. ♀, *S. repens* L. ♀.

Alle Pflanzen wurden für dieses Projekt markiert, um Verwechslungen im Verlauf der Studie zu vermeiden. Es wurden die Blätter und diesjährigen Triebe zu den folgenden Daten gesammelt: 10.05.2016, 06.06.2016, 05.07.2016, 01.08.2016, 05.09.2016. Dabei wurden die Blätter mit Skalpell von den diesjährigen Trieben abgetrennt und auch die Knospen von den Trieben entfernt. Zum ersten Probenzugdatum konnten lediglich die Blätter einbezogen werden, da die Triebe noch nicht ausgeprägt genug waren. Aufgrund von mikrobiellem Befall konnten die Proben der *S. purpurea* ♀, *S. daphnoides* ♀, *S. dasyclados* ♂ und die Blätter der *S. elaeagnos* ♀ jeweils vom 05.07.2016 nicht einbezogen werden. Da die *S. pentandra* ♂ im September keine Blätter mehr trug, konnten beim letzten Probenzug bei dieser nur die diesjährigen Triebe gesammelt werden.

6.5.3 Trocknung des Pflanzenmaterials

Die Proben wurden in 100 mL Mehrzweck PP-Bechern (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) unter Vakuum über Orangegel bei Raumtemperatur über fünf Tage in Exsikkatoren getrocknet. Dazu wurde das Orangegel täglich gegen frisch regeneriertes (150 °C, über Nacht) ausgewechselt.

Die Wahl dieser Parameter bzgl. der Trocknungsmethodik ist auf mehrere Untersuchungen von Julkunen-Tiitto und Mitarbeitern (Julkunen-Tiitto und Gebhardt, 1992; Julkunen-Tiitto und Sorsa, 2001; Julkunen-Tiitto und Tahvanainen, 1989) zurückzuführen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die höchsten Konzentrationen an Salicylalkoholen und Flavonoiden nach Vakuumtrocknung gefunden werden.

Die Eignung dieser Trocknungsmethode wurde mit einer vergleichbaren Probenmenge an Blättern (Frischmaterial: 46,1 g) und diesjährigen Trieben (Frischmaterial: 56,7 g) einer *S. alba* aus dem Botanischen Garten der Universität Regensburg erprobt. Dabei stellte sich Massenkonzanz nach bereits drei Tagen ein. Für dieses Projekt wurde die Trocknungszeit auf fünf Tage erhöht, um einen ausreichend großen Sicherheitszuschlag zu gewähren. In **Abb. 6-54** ist der Trocknungsverlauf zu diesem Experiment graphisch gezeigt.

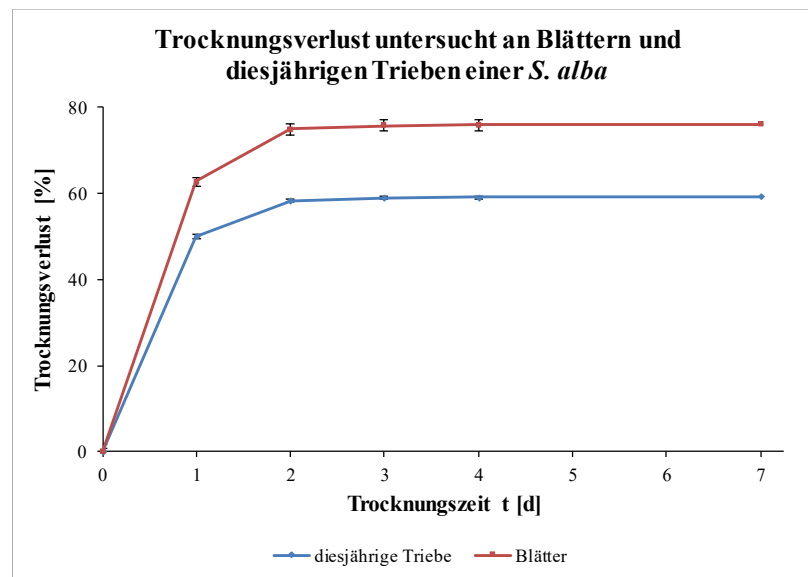


Abb. 6-54: Trocknungsverlauf am Beispiel einer *S. alba* aus dem Botanischen Garten der Universität Regensburg. Die diesjährigen Triebe mit einer Gesamtausgangsmasse von 56,7 g wurden auf drei PP-Becher und die Blätter mit einer Gesamtmasse von 46,1 g auf vier PP-Becher aufgeteilt. Aufgetragen sind die Mittelwerte \pm SD der prozentualen Trocknungsverluste.

6.5.4 *Probenvorbereitung*

Das getrocknete Pflanzenmaterial wurde mit einer UZM 1 Ultrazentrifugalmühle (Retsch GmbH, Haan, Deutschland) unter Verwendung des Siebeinsatzes mit der Größe 0.5 vermahlen. Die Auswaagen aller Proben lagen für die Blätter zwischen 2,0 – 7,4 g und bei den diesjährigen Trieben zwischen 2,0 – 7,6 g.

Das gepulverte Material wurde in einem Ultraschallbad (VWR International GmbH, Taufkirchen, Deutschland) über 30 min in 1,00 mL MeOH mit 0,2 mg/mL Citropten als Int. Std. extrahiert. Dabei wurden definierte Einwaagen von ca. 45,0 mg extrahiert. Abschließend wurden diese Proben zentrifugiert (14000 rpm, 3 min) und durch einen 0,2 µm Perfect Flow® RC Filter (WICOM Germany GmbH, Heppenheim, Deutschland) filtriert.

Die Proben für die massenpektrometrischen Untersuchungen (vgl. Kapitel 6.5.7) wurden identisch, jedoch ohne den Zusatz des Int. Std. hergestellt.

6.5.5 *UPLC®-Methode zur Quantifizierung der Proanthocyanidin-Cluster*

Diese von Hellenbrand et al. (2015b) entwickelte und validierte Methode wurde angewandt, um die Zusammensetzung der PA-Cluster detailliert zu untersuchen. Die Quantifizierung der Cluster erfolgte hier als Catechin. Zur Ermittlung der Kalibriergeraden wurden aus drei Stamm-lösungen jeweils zwei Verdünnungsreihen hergestellt. Der Konzentrationsbereich dieser Verdünnungen erstreckte sich von 0,03 – 156,3 µg/mL. Die aus diesen Messungen resultierende Kalibriergerade und Geradengleichung ist in **Abb. 6-55** gezeigt. Der Säulenofen wurde auf 50 °C justiert und der aktive Preheater aktiviert. Der Fluoreszenz-Detektor wurde mit folgenden Einstellungen betrieben: Gain = 1 (Ermittlung der Kalibriergerade); 0,0 → 4,5 min: Gain = 0,01; 4,5 → 16 min: Gain = 1 (Vermessen der Proben). Das Injektionsvolumen betrug 1 µL. Die Trennung erfolgte mit den Eluenten MeCN + HOAc (98 + 2 [V/V]) (Eluent A) und MeOH/H₂O/HOAc (86 + 12 + 2 [V/V/V]) (Eluent B) mit einem Fluss von 1,00 mL/min unter Verwendung des in **Tabelle 6-9** aufgeführten Gradienten. Die Angabe der Ergebnisse erfolgte als mg pro g Droge [mg/g]. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt.

Acquity UPLC®-Anlage (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland): Acquity H-Class quaternary solvent manager, Acquity FTN autosampler, Acquity eλ PDA detector, Acquity FLR detector ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 316 \text{ nm}$).

Säule: Acquity UPLC® Protein SEC, 200 Å, 1,7 µm, 4,6 x 150 mm (Waters GmbH).

Tabelle 6-9: Gradient zur UPLC®-Quantifizierung der PA-Cluster.

t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	0
6,18	65	35
7,75	60	40
9,00	60	40
10,50	0	100
13,00	0	100
14,26	100	0
16,00	100	0

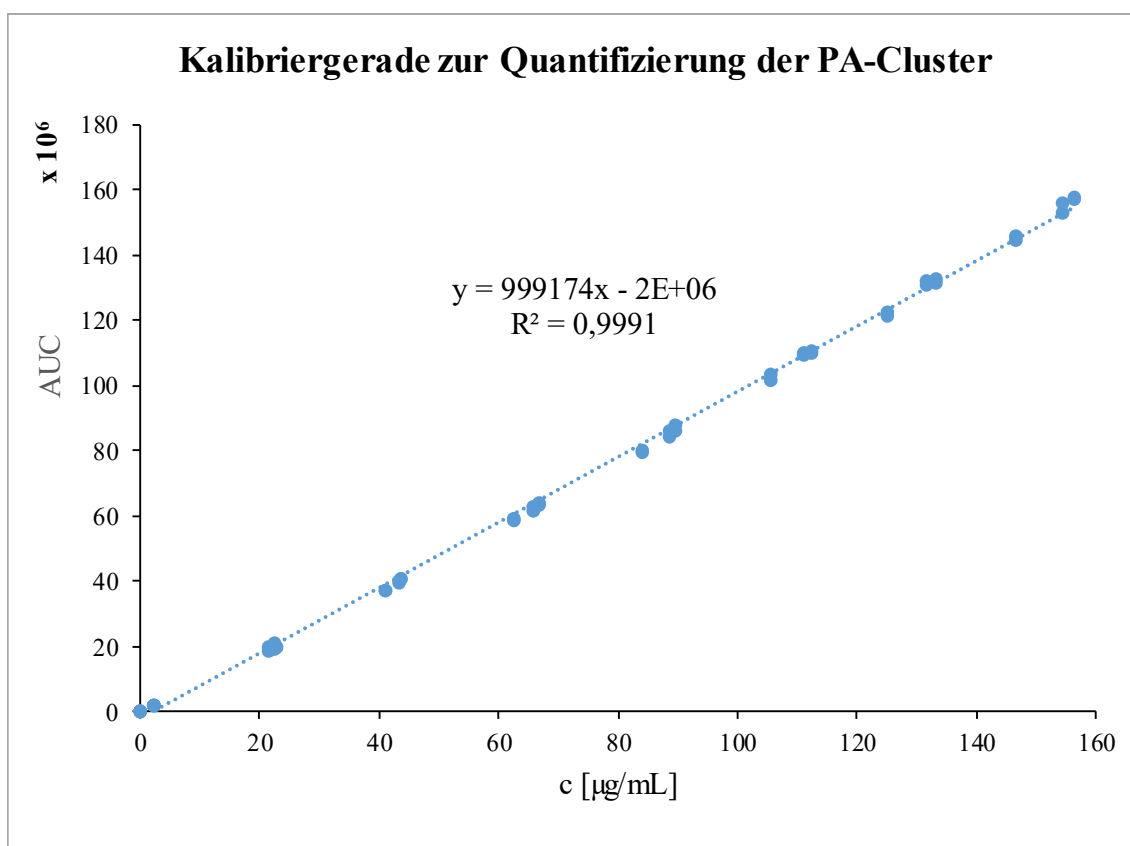


Abb. 6-55: Kalibriergerade zur Quantifizierung der PA-Cluster. Die Detektion erfolgte über einen Fluoreszenz-Detektor ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 316 \text{ nm}$). Die Ermittlung der Kalibriergeraden erfolgte in dreimaliger Bestimmung in Duplikaten.

6.5.6 UPLC®-Methode zur Quantifizierung der sonstigen phenolischen Inhaltsstoffe

Zur Quantifizierung der Salicylalkohole, Flavan-3-ole, Phenylpropansäuren, Flavanone und Flavonoide / Chalkone wurde eine RP-18-UPLC®-Methode entwickelt. Dabei wurde die identische UPLC®-Anlage, wie in Kapitel 6.5.5 beschrieben, verwendet (Detektion bei 279,0 nm). Das Injektionsvolumen betrug 1,00 µL, der Fluss 0,5 mL/min. Der Säulenofen war auf 50 °C justiert, wobei auch hier der aktive Preheater aktiviert war. Der zugehörige Gradient mit den Eluenten H₂O + 1% FA (Eluent A) und MeCN + 1% FA (Eluent B) ist in **Tabelle 6-10** gezeigt. Als Säule wurde eine Luna Omega 1,6 µm C18 100 Å 100 x 2,1 mm (Phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg, Deutschland) verwendet. Probenherstellung erfolgte wie in Kapitel 6.5.4 beschrieben. Zur Quantifizierung wurden Korrekturfaktoren (Rücker et al. 2008) ermittelt und die Kalibriergerade des Citroptens erarbeitet. Dazu wurden je drei Stammlösungen hergestellt, aus welchen jeweils zwei Verdünnungsreihen generiert wurden. Die Kalibrierlösungen des Citroptens wurden mit MeOH hergestellt und zur Bestimmung der Korrekturfaktoren in MeOH + 0,2% Citropten [m/V] verwendet. Alle ermittelten Kalibriergeraden sind in **Abb. 6-57** dargestellt. Die Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Substanzklassen erfolgte über die UV-Maxima der UV-Spektren (200 – 400 nm). Alle für die Zuordnung und Berechnung benötigten Parameter sind in **Tabelle 6-11** aufgeführt. Um einen besseren Eindruck für die Stoffklassenzuordnung zu vermitteln, ist in **Abb. 6-56** ein Beispielchromatogramm mit jeweils einer exemplarischen Verbindung jeder Klasse zusammen mit den zugehörigen UV-Spektren dargestellt. Zusätzlich wurden Catechin und Epicatechin über Referenzsubstanzen in den Chromatogrammen identifiziert. Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte mit folgender Formel:

$$c(\text{Analyt}) = \text{Korrekturfaktor} \times \frac{AUC(\text{Analyt})}{AUC(\text{Int. Std.})} \times c(\text{Int. Std.})$$

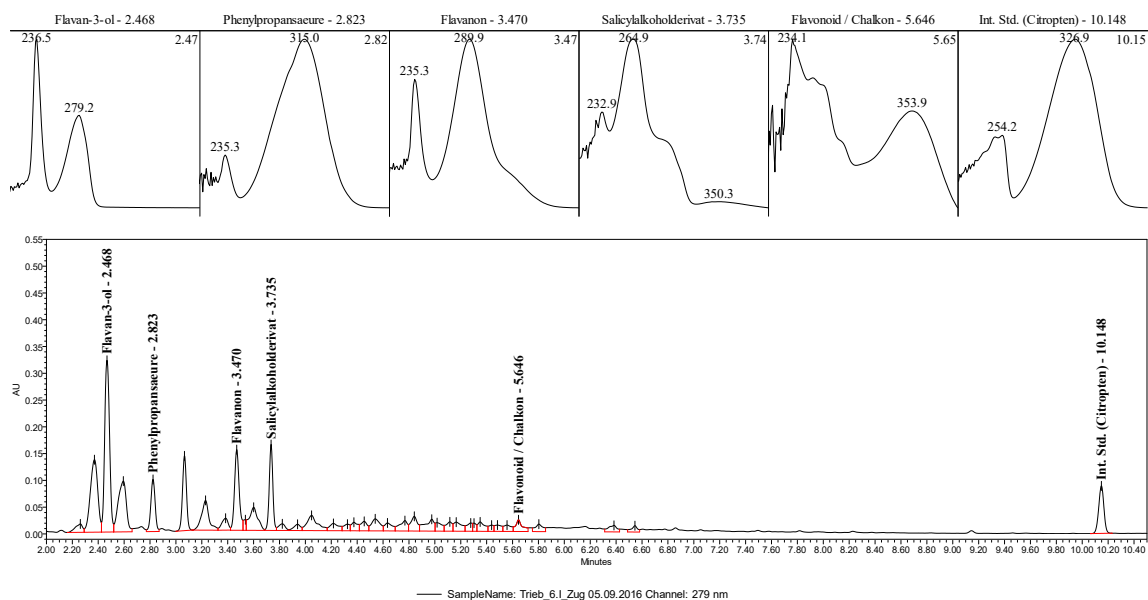
Die erhaltene Konzentration wurde auf die Einwaage an Drogenmaterial bezogen und als mmol Analyt pro g Droge [mmol/g] angegeben. Die Konzentrationen des Catechins und Epicatechins wurden als mg Analyt pro g Droge [mg/g] umgerechnet, um eine bessere Vergleichbarkeit zu den quantifizierten PA-Clustern zu erreichen. Alle Messungen erfolgten als Triplikate. Aufgrund schlechter Peak purities des Int. Std. in allen Proben der *S. elaeagnos* ♀ vom 10.05.2016 bis zum 07.07.2016 und in den Proben der Blätter vom 05.09.2016 der *S. fragilis* ♀ und *S. alba* ♂, wurden AUCs des Int. Std. durch den Durchschnittswert der AUCs aus zwei Injektionen der jeweils verwendeten Lösung des Int. Std. ersetzt.

Tabelle 6-10: UPLC®-Gradient zur Quantifizierung der phenolischen Inhaltsstoffe über eine RP-18-Säule.

t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	95	5
0,5	95	5
9,0	70	30
10,5	50	50
11,5	0	100
14,0	0	100
15,0	95	5
17,0	95	5

Tabelle 6-11: Parameter zur Zuordnung und Berechnung der Peaks als ihre jeweiligen Modellverbindungen.

	Salicylkohole	Flavan-3-ole	Flavanone	Phenylpropan-säuren	Chalkone / Flavonoide
UV-Maximum [nm]	264 - 274	274 - 284	284 - 294	305 - 330	330 - 380
Berechnet als	Salicin	Catechin	Hesperetin	Kaffeesäure	Quercetin
Korrekturfaktor	6,84	0,61	0,23	0,16	0,37

Abb. 6-56: Chromatogramm der diesjährigen Triebe der *S. caprea* ♀ vom 05.09.2016 mit Beispielpeaks inklusive ihrer UV-Spektren. Die Detektion erfolgte bei 279 nm.

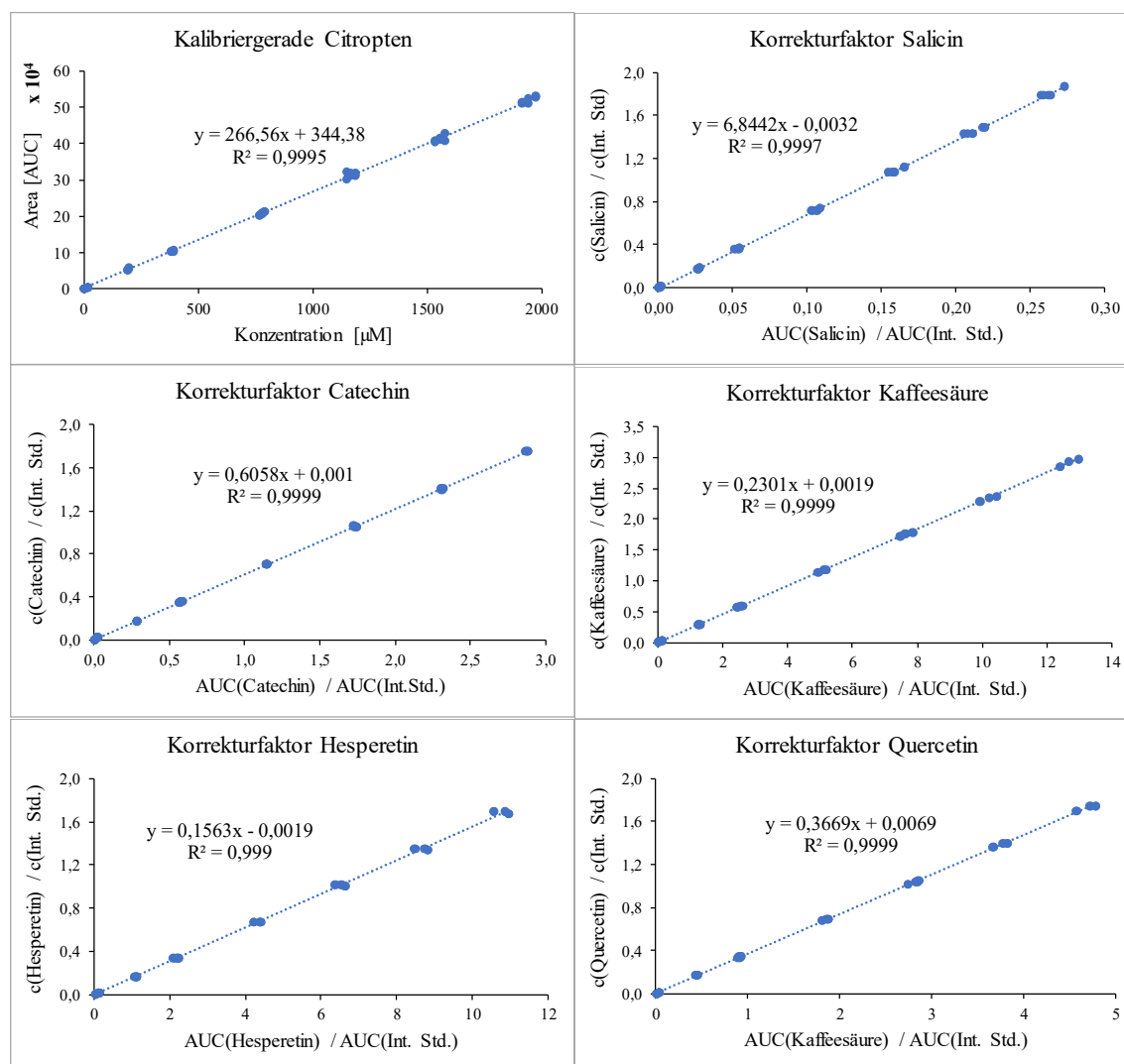


Abb. 6-57: Kalibriergerade des Int. Std. und die Funktionen zur Ermittlung der Korrekturfaktoren. Alle Experimente wurden in dreimaliger Bestimmung in Duplikaten durchgeführt. Die Steigungen aus den dargestellten Funktionen des Salicins, Catechins, Quercetins, Hesperetins und der Kaffeesäure entsprechen den jeweiligen Korrekturfaktoren für die Berechnung. Für die Berechnungen wurden diese auf zwei Nachkommastellen gerundet. Die Detektion erfolgte bei 279,0 nm.

6.5.7 Massenspektrometrische Untersuchung zur Identifizierung der möglichen Markersubstanzen 6''-O-trans-p-Cumaroylisosalipurposid und Catechin-3-O-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure)-ester

Mit dieser HRMS/MS-Methode wurde qualitativ in den Blättern und diesjährigen Trieben der Proben vom 01.08.2016 auf die Anwesenheit der Verbindungen 6''-O-trans-p-Cumaroylisosalipurposid und Catechin-3-O-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure)-ester geprüft. Dabei wurde die in Kapitel 4.5.4 beschriebene UHPLC-Anlage I verwendet. Von jeder Probe wurden für diese Untersuchung 1,00 µL injiziert. Der Säulenofen wurde auf 50 °C eingestellt und die chromatographische Trennung unter Verwendung einer Luna Omega 1,6 µm C18 100 Å 50 x 2,1 mm (Phenomenex Ltd. Deutschland) bei einem Fluss von 0,5 mL/min und dem in **Tabelle 6-12** beschriebenen Gradienten mit H₂O (Eluent A) und MeCN (Eluent B) mit jeweils 0,1% FA realisiert.

Für das Q-TOF 6540 UHD (Agilent) Massenspektrometer mit einer Jet Stream ESI Ionenquelle (Agilent) wurden folgende Parameter gewählt: Aufnahmebereich m/z 80 - 1400 im negativen Modus, 4 MS Scans/s, 6 MS/MS Scans/s, Kollisionsenergie 25 eV, Gas- und Hüllgastemperatur 300 °C, Gas- und Hüllgasfluss 8 L/min, Nebulizer 40 psig und eine Fragmentorspannung von 120 eV.

Die Verbindung Catechin-3-O-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure)-ester wurde qualitativ über die Tochterfragmente m/z 111,0450, m/z 125,0246, m/z 165,0190 und m/z 289,0719 und das Elternfragment m/z 427,1035 [M-H]⁻ bei $R_t = 5,1$ min identifiziert. Für den Nachweis der Substanz 6''-O-trans-p-Cumaroylisosalipurposid wurde das in Kapitel 3.3 gewonnene Isolat verwendet. Für dieses wurde eine $R_t = 9,54$ min detektiert und via HRMS/MS aus dem Elternfragment m/z 579,1508 [M-H]⁻ die Tochterfragmente m/z 125,0245, m/z 151,0040 und m/z 271,0624 ermittelt. All diese Informationen wurden für den Strukturnachweis der beiden potentiellen chemotaxonomischen Marker in den genannten Proben herangezogen.

Tabelle 6-12: UHPLC-Gradient zur Identifizierung der Verbindungen 6‘‘-*O-trans-p*-Cumaroylisosalipurposid und Catechin-3-*O*-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure)-ester über eine RP-18-Säule via einer UHPLC-ESI-HRMS/MS-Methode.

t [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	95	5
0,5	95	5
9,0	70	30
10,5	50	50
11,5	0	100
13,0	0	100
13,1	95	5
14,2	95	5

6.5.8 Gesamtphenol- und Gesamtgerbstoffbestimmung

Diese Methode wurde wie in Kapitel 5.5.3 beschrieben durchgeführt, um den Gesamtphenol- und Gesamtgerbstoffgehalt in den Proben abzuschätzen. Zur Probenvorbereitung wurden entweder 50 oder 100 µL aus den bereits hergestellten Proben (vgl. Kapitel 6.5.4) in ein 1,5 mL SuperSpin™ microtube (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) überführt. Anschließend wurde das Lösungsmittel (MeOH) unter Vakuum eingedampft und der Rückstand mit 1,00 mL H₂O extrahiert. Diese Lösungen waren die GPL und das weitere Versuchsprotokoll wurde wie in Kapitel 5.5.3 beschrieben befolgt. Der Gehalt an Phenolen und Gerbstoffen wurde als Catechin-Äquivalente berechnet und auf die Einwaage an Drogenmaterial bezogen. Dabei war die 1 + 9 [V/V], bzw. 1 + 19 [V/V] Verdünnung durch die Probenvorbereitung zu beachten. Folgende Funktion diente zur Berechnung:

$$\text{Gehalt [\%]} = \frac{(\text{Absorption} - 0,1164)}{5,1031 \times m_{\text{Droge}} [\text{mg}]} \times 100$$

6.5.9 NMR-Spektroskopie und statistische Auswertung mittels Hauptkomponentenanalyse

Diese Methode diente zur Untersuchung des Metaboloms der Blätter vom Probenzug am 01.08.2016. Dazu wurden von jeder Probe ca. 50,0 mg in ein 1,5 mL SuperSpin™ microtube (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) eingewogen und in 1,00 mL DMSO- d_6 + 0,03% TMS über 30 min im Ultraschallbad (VWR International GmbH) extrahiert. Die Ansätze wurden zentrifugiert (14000 rpm, 3 min) und die Überstände in NMR-Tubes überführt. Es wurden die ^1H -NMR-Spektren mit 64 Scans mit einem AVANCE 300 (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) bei 300.13 MHz (^1H -NMR) vermessen. Die Spektren wurden einer Bucket-Integration von -0,02 ppm bis 14,02 ppm in 0,04 ppm Intervallen unterzogen. Im ersten Intervall (-0,02 ppm bis 0,02 ppm) befand sich das TMS-Signal, das zur Kalibrierung aller Integrale diente. Dieses Signal wurde auf zehn H definiert. Die erhaltenen Integrale wurden auf die Einwaagen der Proben normiert. Somit wurden für jedes Integral die Anzahl H / mg Droge berechnet. Diese Datensätze dienten zur Ermittlung statistischer Unterschiede zwischen den verschiedenen Individuen. Alle ^1H -NMR-Spektren wurden in einem Triplikat vermessen.

Die statistische Aufarbeitung der Spektren von 3.98 – 8.22 ppm erfolgte mit der Statistiksoftware R 3.4.0 (R Core Team, 2017), der Benutzeroberfläche RStudio 1.0.143 (RStudio Team, 2016) und den Packages „stats“ (R Core Team, 2017) und „pca3d“ (Weiner, 2017). Im Folgenden ist der Quellcode dargestellt, mit dem die Berechnungen über eine Singulärwertzerlegung (Kessler, 2008a; R Core Team, 2017) und das Erstellen der Grafiken erfolgte:

```
# Festlegen des Dateipfades, in dem die Daten hinterlegt sind und gearbeitet
# werden soll.
setwd("C:/Uni Regensburg/Salix Screening 2016/NMR-Metabolom-Studie/PCA R")

# Überprüfen des vorher festgelegten Arbeitspfades
getwd()

# Laden der library "stats", diese enthält die Funktion prcomp(), über welche
# die Hauptkomponenten berechnet werden. Vor erstem Benutzen muss das "stats"
# package über folgenden Befehl installiert werden: install.packages(stats)
library(stats)

# Laden der library "pca3d", diese enthält die Funktionen pca2d() und pca3d()
# über welche die Graphiken erstellt werden. Vor erstem Benutzen muss das
# "pca3d" package über folgenden Befehl installiert werden:
# install.packages(pca3d)
library(pca3d)

# Einlesen der Daten aus einer CSV-Datei, welche aus Microsoft Excel
# exportiert wurde, und speichern in der Variablen "daten". Dabei ist für die
```

```
# Statistik wichtig, dass die Variablen in Spalten gegliedert sind (Species,  
# Subgenus, Sektion, Buckets). Die Beobachtungen müssen in Zeilen angeordnet  
# sein (Proben). Trennzeichen in der CSV-Datei sind ";" und Dezimalzeichen  
# ",", ". Der Parameter "header = TRUE" gibt an, dass die erste Zeile  
# Überschriften sind.  
daten <- read.csv2("NMR_mean_komplett.csv", header = TRUE)  
  
# Extrahieren der NMR-Daten von 3.98 ppm (Spalte 254) bis 8.22 ppm  
# (Spalte 149) und speichern in der Variable nmr.  
nmr <- daten[,149:254]  
  
# Extrahieren der Probenamen und speichern in der Variable species.  
species <- daten[,1]  
  
# Extrahieren der Subgenera und speichern in der Variable Subgenus.  
Subgenus <- daten[,2]  
  
# Extrahieren der Sektionen und speichern in der Variable section.  
section <- daten[,3]  
  
# Durchführung der Hauptkomponentenanalyse der NMR-Daten über die Funktion  
# "prcomp". Der Parameter "center" bezweckt eine Zentrierung aller Variablen  
# auf den Nullpunkt, die Aktivierung von "scale." stellt die Univarianz aller  
# Variablen her.  
pca.salix <- prcomp(nmr, center = TRUE, scale. = TRUE)  
  
# Ausgabe der Hauptkomponenten zusammen mit ihren Anteilen an der  
# Gesamtvarianz.  
summary(pca.salix)  
  
# Graphische Darstellung der Anteile der Gesamtvarianz der Hauptkomponenten.  
plot(pca.salix)  
  
# Ausgabe der graphischen 2D-Darstellung der Ergebnisse der  
# Hauptkomponentenanalyse. Der Parameter "group" färbt die Datenpunkte nach  
# Sektionen ein. Der Parameter "show.labels" ist für die Datenbeschriftung  
# zuständig, "labels.col" legt eine alternative Farbe der  
# Datenpunktbeschriftung fest, "radius" legt die Größe der Datenpunkte fest,  
# "show.legend" erzeugt eine Legende und definiert die Position selbiger.  
pca2d(pca.salix, group = section, show.labels = species, labels.col = "red",  
radius = 2, legend = "right")  
  
# Ausgabe der graphischen 3D-Darstellung der Ergebnisse der  
# Hauptkomponentenanalyse. Der Parameter "group" färbt die Datenpunkte nach  
# Sektionen ein. Der Parameter "show.labels" ist für die Datenbeschriftung  
# zuständig, "labels.col" legt eine alternative Farbe der  
# Datenpunktbeschriftung fest, "radius" legt die Größe der Datenpunkte fest,  
# "show.legend" erzeugt eine Legende und definiert die Position selbiger,
```

```
# "show.shadows" erzeugt Linien, um den Abstand der Messpunkte zur  
# horizontalen Ebene besser abschätzen zu können.  
pca3d(pca.salix, group = section, show.labels = species, labels.col = "red",  
radius = 2, legend = "right", show.shadows = TRUE)
```

7 Abschließende Zusammenfassung

Der erste Abschnitt der Arbeit behandelt die pharmazeutische und ökologische Bedeutung der Weiden (*Salix* L., Salicaceae) und der Proanthocyanidine. Außerdem wurden die für *Salix* Spezies relevanten phenolischen Stoffgruppen herausgearbeitet. Weiter wurden die in dieser Arbeit behandelten Spezies vorgestellt (*S. pentandra*, *S. fragilis*, *S. alba*, *S. caprea*, *S. cinerea*, *S. caprea* x *cinerea*, *S. dasyclados*, *S. elaeagnos*, *S. daphnoides*, *S. repens*, *S. purpurea*) und ein beispielhafter Überblick über die jeweils bestehende Literatur gegeben.

Im zweiten Abschnitt wird die Isolierung oligomerer Procyanidine aus *S. daphnoides* vorgestellt. In diesem Rahmen konnten elf Procyanidine gewonnen und deren Strukturen bewiesen werden. Außerdem wurden 15 weitere Verbindungen dieser Klasse isoliert und so gut wie möglich charakterisiert, da aufgrund zu geringer Ausbeuten keine vollständigen NMR-Datensätze zur Strukturaufklärung gewonnen werden konnten. Zusätzlich wurden drei Cluster erhalten, die chromatographisch nicht komplett aufgetrennt werden konnten. Einer dieser Cluster enthielt Massenfragmente, die auf A-Typ-Anteile in den Molekülen hindeutete. Dagegen wurden in den anderen beiden Clustern Massenfragmente detektiert, die auf Propelargonidin-Anteile schließen ließen.

Der dritte Abschnitt behandelt eine vergleichende analytische Charakterisierung zweier proanthocyanidinreicher Fraktionen, die sich in ihrem chromatographischen Verhalten während der Auftrennung an Sephadex® LH-20 unterschieden. Dabei konnten vor allem unterschiedliche Kettenlängen und variierende Prodelphinidin-Anteile herausgearbeitet werden.

Im vierten Abschnitt wird die Vereinfachung und Optimierung der Methode 2.8.14 aus dem Europäischen Arzneibuch vorgestellt. Ziel war es, dieses Messprinzip zur Abschätzung des Gesamtphenol- und Gesamtgerbstoffgehalts für Untersuchungen mit einem großen Probendurchsatz zu optimieren. Dabei wurde dieses Verfahren auf einen Mikrotitermaßstab herunterskaliert und bzgl. aller relevanten und für eine Konventionsmethode umsetzbaren Parameter validiert.

Der fünfte und letzte Abschnitt beschreibt ein Screening-Projekt an 13 Weidenindividuen bezüglich ihres phenolischen Inhaltsstoffspektrums. Dabei wurden die Jahresverläufe der für die Gattung *Salix* relevanten Stoffgruppen (Flavan-3-ole, Salicylalkoholderivate, Flavanone, Flavonoide und Chalkone, Phenylpropansäuren) während der Wachstumsaison 2016 (Mai - September) in den diesjährigen Trieben und Blättern als Gruppen analysiert. Besondere Aufmerksamkeit erfuhren dabei die Proanthocyanidine, die in einer separaten UPLC®-Methode

nach ihren Polymerisationsgraden aufgetrennt und als solche Cluster quantifiziert wurden. Im Rahmen dieser Studie konnten Zusammenhänge zwischen einem Hybriden (*S. caprea* x *cinerea*) und seinen Eltern hergestellt werden. An den Beispielen von *S. caprea* und *S. daphnoides* konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen den Geschlechtern gefunden werden. Weiter deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass Vertreter des Subgenus *Salix* (*S. pentandra*, *S. fragilis*, *S. alba*) im Gegensatz zu den anderen Weiden aus der Subgattung *Vetrix* die polymeren Proanthocyanidine gegenüber den oligomeren bevorzugt bilden. Außerdem wurde qualitativ via UHPLC-MS/MS in den Blättern und Trieben eines exemplarischen Probenzugs (August) nach den potentiellen chemotaxonomischen Markern Catechin-3-*O*-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonsäure)-ester und 6“-*O-trans-p*-Cumaroylisosalipurposid in den beiden untersuchten Geweben gescreent. Weiter wurde die analytische Erfassung des Gesamtmetaboloms via ¹H-NMR exemplarisch an den Blättern des gleichen Probenzugs erprobt. Die Resultate ließen erste Rückschlüsse bzgl. der Systematik und möglicher optimaler Erntezeitpunkte zu, müssen aber durch eine Ausweitung des Probenumfangs und Erhöhung der Stichprobenzahl auf ein solideres Fundament gestellt werden.

Summary

The first part of this thesis explains the pharmaceutical and ecological impact of willows (*Salix* L., Salicaceae) and of the proanthocyanidins. In addition, the relevant groups of phenolic compounds in *Salix* species are depicted. Further, the investigated species (*S. pentandra*, *S. fragilis*, *S. alba*, *S. caprea*, *S. cinerea*, *S. caprea* x *cinerea*, *S. dasyclados*, *S. elaeagnos*, *S. daphnoides*, *S. repens*, *S. purpurea*) were introduced with a short literature overview.

The second part contains the isolation of oligomeric procyanidins from *S. daphnoides*. Thus, eleven procyanidins were gained and their structures were elucidated. Further 15 compounds were isolated and characterized as good as possible, since amounts were much too low to get complete NMR-datasets. Additionally, three clusters were yielded, that could not be finally separated. One of these clusters contained mass-fragments, being characteristic for A-type elements and in the other two clusters, mass-fragments were detected, that may result from prodelphinidin monomers.

In the third part, a comparing analytical characterization of two proanthocyanidin-enriched fractions is described. The fractions differ in their chromatographic behavior on Sephadex® LH-20. Here, main differences were detected in chain lengths and varying prodelphinidin amounts.

The forth part describes a simplification and optimization of the European pharmacopoea's method 2.8.14. Aim was to optimize this experiment to estimate the amount of total phenols and tannins due to a higher throughput. Hence, the method was downscaled to 96-well scale and validated to all parameters realizable for a suchlike convention method.

The fifth and final part deals with a screening project on 13 willow individuals concerning their phenolic profile. The concentrations during the 2016 growing-season (May – September) for all relevant compound classes for the genus *Salix* (flavan-3-ols, salicylic alcohol derivatives, flavanones, flavonoids and chalcones, phenylpropionic acids) were monitored as groups in this year's sprouts and leaves. The proanthocyanidins were investigated in more detail, using a specialized UPLC®-method to separate and quantify them due to their degrees of polymerization. In this study, a hybrid (*S. caprea* x *cinerea*) was compared to its parents and both sexes of *S. caprea* and *S. daphnoides* were considered. While the hybrid was clearly influenced by both parents, differences between the sexes were poor. Further results suggested, that members of the subgenus *Salix* (*S. pentandra*, *S. fragilis*, *S. alba*) favor the polymeric proanthocyanins in contrast to the other willows belonging to the subgenus *Vetrix*. In addition, the August samples (this year's sprouts and leaves) were screened via UHPLC-MS/MS for the possible chemotaxonomical marker compounds catechin-3-*O*-(1-hydroxy-6-oxo-2-cyclohexene-1-carboxylic)-ester and 6'-*O*-*trans-p*-cumaroylisosalipurposid. Further, the complete metabolome was investigated using ¹H-NMR with the leaves (August). The results enabled a discussion about optimum date for harvesting the medicinal drug willow bark and the chemotaxonomical power of the phenolics in willows for systematical differentiation. However, the number of samples of more individuals from one species must be increased in upcoming projects to confirm these preliminary hints, as well as more different *Salix* species should be included in further studies.

8 Literaturverzeichnis

- 2.8.14: Gerbstoffe in pflanzlichen Drogen, in: Europäisches Arzneibuch 8. Ausgabe, 2. Nachtrag (Ph.Eur. 8.2). Amtliche deutsche Ausgabe, 1st ed. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 2015, S. 383.
- Aas, G. Bäume und Sträucher. Bestimmung wild wachsender Gehölze Mitteleuropas vorrangig nach vegetativen Merkmalen, Bayreuth, 2016.
- Aas, G. und Holdenrieder, O. Das Salicetum des Ökologisch-Botanischen Gartens Bayreuth: Eine einzigartige Spezialsammlung für Forschung und Lehre. *Mitt. Dtsch. Dendrol. Ges.*, 2009 (94), 95–106.
- Audette, R.C.S; Blunden, G; Steele, J. W. und Wong, C.S.C. Thin-layer chromatography of phenolic glycosides and its use as a screening procedure for the genus *Salix*. *J. Chromatogr. A*, 1966, 25, 367–372. doi: 10.1016/S0021-9673(01)98254-8.
- Ayres, M. P; Clausen, T. P; MacLean, Jr., S. F; Redman, A. M. und Reichardt, P. B. Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. *Ecology*, 1997, 78 (6), 1696–1712.
- Babst, B. A; Harding, S. A. und Tsai, C.-J. Biosynthesis of phenolic glycosides from phenylpropanoid and benzenoid precursors in *Populus*. *J. Chem. Ecol.*, 2010, 36 (3), 286–297. doi: 10.1007/s10886-010-9757-7.
- Baert, F; Fouret, R; Sliwa, M. und Sliwa, H. Structural studies of flavan derivatives: effect of overcrowding on conformation and hydrogen bonding of *cis*- and *trans*-diphenyl flavan-3 yl carbinols. *Tetrahedron*, 1980, 36 (19), 2765–2774. doi: 10.1016/0040-4020(80)80153-0.
- Bajpai, V; Singh, A; Chandra, P; Negi, M. P. S; Kumar, N. und Kumar, B. Analysis of phytochemical variations in dioecious *Tinospora cordifolia* stems using HPLC/QTOF MS/MS and UPLC/QqQLIT -MS/MS. *Phytochem. Anal.*, 2016, 27 (2), 92–99. doi: 10.1002/pca.2601.
- Barrett, M. W; Klyne, W; Scopes, P. M; Fletcher, A. C; Porter, L. J. und Haslam, E. Plant proanthocyanidins. Part 6. Chiroptical studies. Part 95. Circular dichroism of procyanidins. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1979, 2375–2377. doi: 10.1039/p19790002375.

- Baudry, A; Heim, M. A; Dubreucq, B; Caboche, M; Weisshaar, B. und Lepiniec, L. TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 2004, 39 (3), 366–380. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02138.x.
- Behrens, A; Maie, N; Knicker, H. und Kogel-Knabner, I. MALDI-TOF mass spectrometry and PSD fragmentation as means for the analysis of condensed tannins in plant leaves and needles. *Phytochemistry*, 2003, 62 (7), 1159–1170.
- Bicker, J; Petereit, F. und Hensel, A. Proanthocyanidins and a phloroglucinol derivative from *Rumex acetosa* L. *Fitoterapia*, 2009, 80 (8), 483–495. doi: 10.1016/j.fitote.2009.08.015.
- Bilia, A. R; Bergonzi, M. C; Mazzi, G. und Vincieri, F. F. Analysis of plant complex matrices by use of nuclear magnetic resonance spectroscopy: St. John's wort extract. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49 (5), 2115–2124.
- Binns, W. W. und Blunden, G. Effects of hybridization on leaf constituents in the genus *Salix*. *Phytochemistry*, 1969, 8 (7), 1235–1239. doi: 10.1016/S0031-9422(00)85563-6.
- Binns, W. W; Blunden, G. und Woods, D. L. Distribution of leucoanthocyanidins, phenolic glycosides and imino-acids in leaves of *Salix* species. *Phytochemistry*, 1968, 7 (9), 1577–1581. doi: 10.1016/S0031-9422(00)88609-4.
- Boatright, J; Negre, F; Chen, X; Kish, C. M; Wood, B; Peel, G; Orlova, I; Gang, D; Rhodes, D. und Dudareva, N. Understanding *in vivo* benzenoid metabolism in petunia petal tissue. *Plant Physiol.*, 2004, 135 (4), 1993–2011. doi: 10.1104/pp.104.045468.
- Boeckler, G. A; Towns, M; Unsicker, S. B; Mellway, R. D; Yip, L; Hilke, I; Gershenzon, J. und Constabel, C. P. Transgenic upregulation of the condensed tannin pathway in poplar leads to a dramatic shift in leaf palatability for two tree-feeding Lepidoptera. *J. Chem. Ecol.*, 2014, 40 (2), 150–158. doi: 10.1007/s10886-014-0383-7.
- Bolan, M. und Steele, J. W. Phytochemistry of *Salix* species. I. A gas-liquid chromatographic procedure for the separation and identification of phenolic glycosides. *J. Chromatogr.*, 1968, 36 (1), 22–30.
- Bonaterra, G. A; Heinrich, E. U; Kelber, O; Weiser, D; Metz, J. und Kinscherf, R. Anti-inflammatory effects of the willow bark extract STW 33-I (Proaktiv®) in LPS-activated human monocytes and differentiated macrophages. *Phytomedicine*, 2010a, 17 (14), 1106–1113. doi: 10.1016/j.phymed.2010.03.022.

- Bonaterra, G. A; Kelber, O; Weiser, D; Metz, J. und Kinscherf, R. *In vitro* anti-proliferative effects of the willow bark extract STW 33-I. *Arzneim. Forsch.*, 2010b, *60* (6), 330–335. doi: 10.1055/s-0031-1296296.
- Botha, J. J; Ferreira, D. und Roux, D. G. Condensed tannins. Circular dichroism method of assessing the absolute configuration at C-4 of 4-arylflavan-3-ols, and stereochemistry of their formation from flavan-3,4-diols. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1978 (16), 698–700. doi: 10.1039/c39780000698.
- Botha, J. J; Young, D. A; Ferreira, D. und Roux, D. G. Synthesis of condensed tannins. Part 1. Stereoselective and stereospecific syntheses of optically pure 4-arylflavan-3-ols, and assessment of their absolute stereochemistry at C-4 by means of circular dichroism. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1981, 1213–1219. doi: 10.1039/p19810001213.
- Butterweck, V; Liefländer-Wulf, U; Winterhoff, H. und Nahrstedt, A. Plasma levels of hypericin in presence of procyanidin B2 and hyperoside: a pharmacokinetic study in rats. *Planta Med.*, 2003, *69* (3), 189–192. doi: 10.1055/s-2003-38495.
- Chrubasik, S; Eisenberg, E; Balan, E; Weinberger, T; Luzzati, R. und Conradt, C. Treatment of low back pain exacerbations with willow bark extract: A randomized double-blind study. *Am. J. Med.*, 2000, *109* (1), 9–14. doi: 10.1016/S0002-9343(00)00442-3.
- Chrubasik, S; Fiebich, B; Black, A. und Pollak, S. Treating low back pain with a *Salix* extract that inhibits COX 2 and the release of cytokines. *Eur. J. Anaesthesiol.*, 2002, *19* (3), 209–210. doi: 10.1097/00003643-200203000-00013.
- Chrubasik, S. und Pollak, S. Schmerzbehandlung mit pflanzlichen Antirheumatika. *Wien. Med. Wochenschr.*, 2002, *152* (7-8), 198–203. doi: 10.1046/j.1563-258X.2002.11115.x.
- Clausen, T. P; Provenza, F. D; Burritt, E. A; Reichardt, P. B. und Bryant, J. P. Ecological implications of condensed tannin structure: A case study. *J. Chem. Ecol.*, 1990, *16* (8), 2381–2392. doi: 10.1007/BF01017463.
- Committee for Herbal Medicinal Products. European Union herbal monograph on *Salix* [various species including *S. purpurea* L., *S. daphnoides* Vill., *S. fragilis* L.], cortex: EMA/HMPC/860630/2016, London (UK), 2017. Zuletzt geprüft am 06.07.2017.
- Corradi, E; Schmidt, N; Räber, N; Mieri, M. de; Hamburger, M; Butterweck, V. und Potterat, O. Metabolite profile and antiproliferative effects in HaCaT cells of a *Salix reticulata* extract. *Planta Med.*, 2017. doi: 10.1055/s-0043-109098.

- Czochanska, Z; Foo, L. Y; Newman, R. H. und Porter, L. J. Polymeric proanthocyanidins. Stereochemistry, structural units, and molecular weight. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1980, 2278–2286. doi: 10.1039/p19800002278.
- Dauer, A; Rimpler, H. und Hensel, A. Polymeric Proanthocyanidins from the bark of *Hamamelis virginiana*. *Planta Med.*, 2003, 69 (1), 89–91. doi: 10.1055/s-2003-37022.
- Decker, V. H. G; Bandau, F; Gundale, M. J; Cole, C. T. und Albrechtsen, B. R. Aspen phenylpropanoid genes' expression levels correlate with genets' tannin richness and vary both in responses to soil nitrogen and associations with phenolic profiles. *Tree Physiol. (Oxford, U. K.)*, 2016. doi: 10.1093/treephys/tpw118.
- Déprez, S; Mila, I. und Scalbert, A. Carbon-14 biolabeling of (+)-catechin and proanthocyanidin oligomers in willow tree cuttings. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47 (10), 4219–4230.
- Dötterl, S; Glück, U; Jürgens, A; Woodring, J. und Aas, G. Floral reward, advertisement and attractiveness to honey bees in dioecious *Salix caprea*. *PloS one*, 2014, 9 (3), e93421. doi: 10.1371/journal.pone.0093421.
- Drummond, E. M; Harbourne, N; Marete, E; Martyn, D; Jacquier, J; O’Riordan, D. und Gibney, E. R. Inhibition of proinflammatory biomarkers in THP1 macrophages by polyphenols derived from chamomile, meadowsweet and willow bark. *Phytother Res*, 2013, 27 (4), 588–594. doi: 10.1002/ptr.4753.
- E/S/C/O/P monographs: The scientific foundation for herbal medicinal products, 2nd ed. European Scientific Cooperative on Phytotherapy; Thieme, Exeter, U.K., Stuttgart, Germany, New York, 2003.
- Eberhardt, T. L. und Young, R. A. Conifer seed cone proanthocyanidin polymers: characterization by ¹³C NMR spectroscopy and determination of antifungal activities. *J. Agric. Food Chem.*, 1994, 42 (8), 1704–1708. doi: 10.1021/jf00044a023.
- Egloff, C. P. Phenolglykoside einheimischer *Salix*-Arten. Dissertation. Zürich, 1982.
- El-Sayed, M; El-Hashash, M; Mohamed, H. und Abdel-Lateef, E. Phytochemical investigation and *in vitro* antioxidant activity of different leaf extracts of *Salix mucronata* Thunb. *J. App. Pharm. Sci.*, 2015, 80–85. doi: 10.7324/JAPS.2015.501213.

- Enayat, S; Ceyhan, M. Ş; Başaran, A. A; Gürsel, M. und Banerjee, S. Anticarcinogenic effects of the ethanolic extract of *Salix aegyptiaca* in colon cancer cells: involvement of Akt/PKB and MAPK pathways. *Nutr. Cancer*, 2013, 65 (7), 1045–1058. doi: 10.1080/01635581.2013.850966.
- Engel, D. W; Hattingh, M; Hundt, H. K. L. und Roux, D. G. X-Ray structure, conformation, and absolute configuration of 8-bromotetra-*O*-methyl-(+)-catechin. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1978 (16), 695–696. doi: 10.1039/c39780000695.
- Esatbeyoglu, T; Jaschok-Kentner, B; Wray, V. und Winterhalter, P. Structure elucidation of procyanidin oligomers by low-temperature ¹H NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59 (1), 62–69. doi: 10.1021/jf1032334.
- Esatbeyoglu, T; Wray, V. und Winterhalter, P. Dimeric procyanidins: screening for B1 to B8 and semisynthetic preparation of B3, B4, B6, And B8 from a polymeric procyanidin fraction of white willow bark (*Salix alba*). *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58 (13), 7820–7830. doi: 10.1021/jf101023e.
- Feeny, P. P. Effect of oak leaf tannins on larval growth of the winter moth *Operophtera brumata*. *J. Insect Physiol.*, 1968, 14 (6), 805–817. doi: 10.1016/0022-1910(68)90191-1.
- Folin, O. und Ciocalteu, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.*, 1927, 73 (2), 627–650.
- Foo, L. Y. und Porter, L. J. Prodelphinidin polymers: definition of structural units. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1978 (10), 1186–1190. doi: 10.1039/p19780001186.
- Foo, L. Y. und Porter, L. J. Synthesis and conformation of procyanidin diastereoisomers. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1983, 1535–1543. doi: 10.1039/p19830001535.
- Förster, N; Ulrichs, C; Zander, M; Katzel, R. und Mewis, I. Factors influencing the variability of antioxidative phenolic glycosides in *Salix* species. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58 (14), 8205–8210. doi: 10.1021/jf100887v.
- Förster, N; Ulrichs, C; Zander, M; Kätzel, R. und Mewis, I. Influence of the season on the salicylate and phenolic glycoside contents in the bark of *Salix daphnoides*, *Salix pentandra* and *Salix purpurea*. *J. Appl. Bot. Food Qual.*, 2008, 82, 99–102.
- Freischmidt, A. Phytochemische, analytische und pharmakologische *in vitro* Untersuchungen zu den phenolischen Inhaltsstoffen eines standardisierten Weidenrindenextraktes. Dissertation, Regensburg, 2011.

- Freischmidt, A; Jürgenliemk, G; Kraus, B; Okpanyi, S. N; Muller, J; Kelber, O; Weiser, D. und Heilmann, J. Contribution of flavonoids and catechol to the reduction of ICAM-1 expression in endothelial cells by a standardised willow bark extract. *Phytomedicine*, 2012, 19 (3-4), 245–252. doi: 10.1016/j.phymed.2011.08.065.
- Freischmidt, A; Untergehrer, M; Ziegler, J; Knuth, S; Okpanyi, S; Müller, J; Kelber, O; Weiser, D. und Jürgenliemk, G. Quantitative analysis of flavanones and chalcones from willow bark. *Pharmazie*, 2015, 70 (9), 565–568.
- Füssel, U; Dötterl, S; Jürgens, A. und Aas, G. Inter- and intraspecific variation in floral scent in the genus *Salix* and its implication for pollination. *J. Chem. Ecol.*, 2007, 33 (4), 749–765. doi: 10.1007/s10886-007-9257-6.
- Gawlik-Dziki, U; Sugier, D; Dziki, D. und Sugier, P. Bioaccessibility *in vitro* of nutraceuticals from bark of selected *Salix* species. *Sci. World J.*, 2014, 782763. doi: 10.1155/2014/782763.
- Glasl H. Zur Photometrie in der Drogenstandardisierung. *DAZ*, 1983, 123, 1979–1987.
- Gonthier, M.-P; Donovan, J. L; Texier, O; Felgines, C; Remesy, C. und Scalbert, A. Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radical Biol. Med.*, 2003, 35 (8), 837–844.
- Gutiérrez, S. D; Kuri, S. A. und Martín-Herrera, D. The bioguided fractionation and pharmacological activity of an endemic *Salix canariensis* species. *Acta pharm. (Zagreb, Croatia)*, 2017, 67 (2), 265–273. doi: 10.1515/acph-2017-0012.
- Hallgren, P; Ikonen, A; Hjalten, J. und Roininen, H. Inheritance patterns of phenolics in F1, F2, and back-cross hybrids of willows: implications for herbivore responses to hybrid plants. *J. Chem. Ecol.*, 2003, 29 (5), 1143–1158.
- Hammerbacher, A; Paetz, C; Wright, L. P; Fischer, T. C; Bohlmann, J; Davis, A. J; Fenning, T. M; Gershenzon, J. und Schmidt, A. Flavan-3-ols in Norway spruce: biosynthesis, accumulation, and function in response to attack by the bark beetle-associated fungus *Ceratocystis polonica*. *Plant Physiol.*, 2014, 164 (4), 2107–2122. doi: 10.1104/pp.113.232389.
- Han, L.-K; Sumiyoshi, M; Zhang, J; Liu, M.-X; Zhang, X.-f; Zheng, Y.-n; Okuda, H. und Kimura, Y. Anti-obesity action of *Salix matsudana* leaves (Part 1). Anti-obesity action by polyphenols of *Salix matsudana* in high fat-diet treated rodent animals. *Phytother. Res.*, 2003a, 17 (10), 1188–1194. doi: 10.1002/ptr.1404.

- Han, L.-K; Sumiyoshi, M; Zheng, Y.-n; Okuda, H. und Kimura, Y. Anti-obesity action of *Salix matsudana* leaves (Part 2). Isolation of anti-obesity effectors from polyphenol fractions of *Salix matsudana*. *Phytother. Res.*, 2003b, 17 (10), 1195–1198. doi: 10.1002/ptr.1405.
- Hänsel, R; Heise, D. und Pinkewitz, G. Diastereomere Naringeninglukoside in *Salix purpurea*. *Pharm. Acta Helv.*, 1960, 35, 27–29.
- Haukioja, E. Putting the insect into the birch-insect interaction. *Oecologia*, 2003, 136 (2), 161–168. doi: 10.1007/s00442-003-1238-z.
- Heiska, S; Rousi, M; Turtola, S; Meier, B; Tirkkonen, V. und Julkunen-Tiitto, R. The effect of genotype and cultivation method on the total salicylate yield of dark-leaved willows (*Salix myrsinifolia*). *Planta Med.*, 2005, 71 (12), 1134–1139. doi: 10.1055/s-2005-873138.
- Hellenbrand, N; Lechtenberg, M; Petereit, F; Sendker, J. und Hensel, A. Isolation and quantification of oligomeric and polymeric procyanidins in the aerial parts of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Planta Med.*, 2015a, 81 (12-13), 1175–1181. doi: 10.1055/s-0035-1545916.
- Hellenbrand, N; Sendker, J; Lechtenberg, M; Petereit, F. und Hensel, A. Isolation and quantification of oligomeric and polymeric procyanidins in leaves and flowers of Hawthorn (*Crataegus spp.*). *Fitoterapia*, 2015b, 104, 14–22. doi: 10.1016/j.fitote.2015.04.010.
- Hoeber, S; Fransson, P; Prieto-Ruiz, I; Manzoni, S. und Weih, M. Two *Salix* genotypes differ in productivity and nitrogen economy when grown in monoculture and mixture. *Front. Plant Sci.*, 2017, 8, 231. doi: 10.3389/fpls.2017.00231.
- Holdenrieder, O; Rudow, A. und Aas, G. Die Gattung *Salix*. Eine Einführung in die Vielfalt, Biologie und Ökologie der Weiden. *Schweiz. Z. Forstwes.*, 1999, 150 (11), 405–411. doi: 10.3188/szf.1999.0405.
- Holmes, E; Tang, H; Wang, Y. und Seger, C. The assessment of plant metabolite profiles by NMR-based methodologies. *Planta Med.*, 2006, 72 (9), 771–785. doi: 10.1055/s-2006-946682.
- Hostanska, K; Jürgenliemk, G; Abel, G; Nahrstedt, A. und Saller, R. Willow bark extract (BNO1455) and its fractions suppress growth and induce apoptosis in human colon and lung cancer cells. *Cancer Detect. Prev.*, 2007, 31 (2), 129–139. doi: 10.1016/j.cdp.2007.03.001.

- Hsu, F.-L.; Nonaka, G.-I. und Nishioka, I. Acylated flavanols and procyanidins from *Salix sieboldiana*. *Phytochemistry*, 1985, 24 (9), 2089–2092. doi: 10.1016/S0031-9422(00)83128-3.
- Husain, S; Andrews, N. P; Mulcahy, D; Panza, J. A. und Quyyumi, A. A. Aspirin improves endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*, 1998, 97 (8), 716–720. doi: 10.1161/01.CIR.97.8.716.
- ICH Expert Working Group. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), 2005.
- Jones, C. G; Lawton, J. H. und Shachak, M. Organisms as ecosystem engineers. *Oikos*, 1994, 69 (3), 373. doi: 10.2307/3545850.
- Julkunen-Tiitto, R. Chemotaxonomical screening of phenolic glycosides in northern willow twigs by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1985a, 324, 129–139. doi: 10.1016/S0021-9673(01)81312-1.
- Julkunen-Tiitto, R. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J. Agric. Food Chem.*, 1985b, 33 (2), 213–217. doi: 10.1021/jf00062a013.
- Julkunen-Tiitto, R. A chemotaxonomic survey of phenolics in leaves of northern Salicaceae species. *Phytochemistry*, 1986, 25 (3), 663–667. doi: 10.1016/0031-9422(86)88020-7.
- Julkunen-Tiitto, R. Distribution of certain phenolics in *Salix* species (Salicaceae). Dissertation, Joensuu, 1989a.
- Julkunen-Tiitto, R. Phenolic constituents of *Salix*: a chemotaxonomic survey of further finnish species. *Phytochemistry*, 1989b, 28 (8), 2115–2125. doi: 10.1016/S0031-9422(00)97930-5.
- Julkunen-Tiitto, R. und Gebhardt, K. Further studies on drying willow (*Salix*) twigs: the effect of low drying temperature on labile phenolics. *Planta Med.*, 1992, 58 (4), 385–386. doi: 10.1055/s-2006-961494.
- Julkunen-Tiitto, R. und Meier, B. Variation in growth and secondary phenolics among field-cultivated clones of *Salix myrsinifolia*. *Planta Med.*, 1992, 58 (1), 77–80. doi: 10.1055/s-2006-961394.

- Julkunen-Tiitto, R. und Sorsa, S. Testing the effects of drying methods on willow flavanoids, tannins, and salicylates. *J. Chem. Ecol.*, 2001, 27 (4), 779–789. doi: 10.1023/A:1010358120482.
- Julkunen-Tiitto, R; Tahvanainen, J. und Meier, B. The tissue variation of self-defensive phenolics in three willow (Salicaceae) species. *Planta Med.*, 1988, 54 (6), 569–570. doi: 10.1055/s-2006-962574.
- Julkunen-Tiitto, R. und Tahvanainen, J. The effect of the sample preparation method of extractable phenolics of Salicaceae species. *Planta Med.*, 1989, 55 (1), 55–58. doi: 10.1055/s-2006-961825.
- Jürgenliemk, G. und Nahrstedt, A. Dissolution, solubility and cooperativity of phenolic compounds from *Hypericum perforatum* L. in aqueous systems. *Pharmazie*, 2003, 58 (3), 200–203.
- Jürgenliemk, G; Petereit, F. und Nahrstedt, A. Flavan-3-ols and procyanidins from the bark of *Salix purpurea* L. *Pharmazie*, 2007, 62 (3), 231–234. doi: 10.1691/ph.2007.3.6577.
- Kammerer, B; Kahlich, R; Biegert, C; Gleiter, C. H. und Heide, L. HPLC-MS/MS analysis of willow bark extracts contained in pharmaceutical preparations. *Phytochem. Anal.*, 2005, 16 (6), 470–478.
- Kaufeld, A. M; Pertz, H. H. und Kolodziej, H. A chemically defined 2,3-*trans* procyanidin fraction from willow bark causes redox-sensitive endothelium-dependent relaxation in porcine coronary arteries. *J. Nat. Prod.*, 2014, 77 (7), 1607–1614. doi: 10.1021/np500177u.
- Kessler, W. (Ed.). Multivariate Datenanalyse für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik: Ein Lehrbuch, 1st ed. WILEY-VCH, Weinheim, 2008a.
- Kessler, W. Prinzip der Hauptkomponentenanalyse, in: Kessler, W. (Ed.), Multivariate Datenanalyse für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik. Ein Lehrbuch, 1st ed. WILEY-VCH, Weinheim, 2008b.
- Khayyal, M. T; El-Ghazaly, M. A; Abdallah, D. M; Okpanyi, S. N; Kelber, O. und Weiser, D. Mechanisms involved in the anti-inflammatory effect of a standardized willow bark extract. *Arzneim. Forsch.*, 2005, 55 (11), 677–687. doi: 10.1055/s-0031-1296917.

- Klongsiriwet, C; Quijada, J; Williams, A. R; Mueller-Harvey, I; Williamson, E. M. und Hoste, H. Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *Int. J. Parasitol.*, 2015, 5 (3), 127–134. doi: 10.1016/j.ijpddr.2015.06.001.
- Knuth, S; Abdelsalam, R. M; Khayyal, M. T; Schweda, F; Heilmann, J; Kees, M. G; Mair, G; Kees, F. und Jürgenliemk, G. Catechol conjugates are *in vivo* metabolites of *Salicis cortex*. *Planta Med.*, 2013, 79 (16), 1489–1494. doi: 10.1055/s-0033-1350898.
- Knuth, S; Schübel, H; Hellemann, M. und Jürgenliemk, G. Catechol, a bioactive degradation product of salicortin, reduces TNF- α induced ICAM-1 expression in human endothelial cells. *Planta Med.*, 2011, 77 (10), 1024–1026. doi: 10.1055/s-0030-1270722.
- Kolodziej, H. Beitrag zur Kenntnis polyphenolischer Inhaltsstoffe in *Nelia Meyeri* Schwant. Dissertation, Münster, 1980.
- Kolodziej, H. Synthesis and characterization of procyanidin dimers as their peracetates and octamethyl ether diacetates. *Phytochemistry*, 1986, 25 (5), 1209–1215. doi: 10.1016/S0031-9422(00)81582-4.
- Kolodziej, H. [2',2']-(+)-Catechin-(+)-taxifolin from commercial willow bark: structure, bonding positions and oxidative cleavage. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1988 (2), 219–226. doi: 10.1039/P19880000219.
- Kolodziej, H. Oligomeric flavan-3-ols from medicinal willow bark. *Phytochemistry*, 1990, 29 (3), 955–960. doi: 10.1016/0031-9422(90)80054-K.
- Kopelke, J.-P; Nyman, T; Cazelles, K; G., D; Vissault, S. und Roslin, T. Food-web structure of willow-galling sawflies and their natural enemies across Europe. *Ecology*, 2017. doi: 10.1002/ecy.1832.
- Krauze-Baranowska, M; Pobłocka-Olech, L; Głód, D; Wiwart, M; Zieliński, J. und Migas, P. HPLC of flavanones and chalcones in different species and clones of *Salix*. *Acta Pol. Pharm.*, 2013, 70 (1), 27–34.
- Lauron-Moreau, A; Pitre, F. E; Argus, G. W; Labrecque, M. und Brouillet, L. Phylogenetic relationships of American willows (*Salix* L., Salicaceae). *PloS one*, 2015, 10 (4), e0121965. doi: 10.1371/journal.pone.0121965.

- Lehrman, A; Torp, M; Stenberg, J. A; Julkunen-Tiitto, R. und Björkman, C. Estimating direct resistance in willows against a major insect pest, *Phratora vulgatissima*, by comparing life history traits. *Entomol. Exp. Appl.*, 2012, 144 (1), 93–100. doi: 10.1111/j.1570-7458.2012.01244.x.
- Li, H; Cheng, K; Wong, C; Fan, K; Chen, F. und Jiang, Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem.*, 2007, 102 (3), 771–776. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.06.022.
- Lindroth, R. L. und Pajutee, M. S. Chemical analysis of phenolic glycosides: Art, facts, and artifacts. *Oecologia*, 1987, 74 (1), 144–148. doi: 10.1007/BF00377359.
- Long, M. C; Nagegowda, D. A; Kaminaga, Y; Ho, K. K; Kish, C. M; Schnepf, J; Sherman, D; Weiner, H; Rhodes, D. und Dudareva, N. Involvement of snapdragon benzaldehyde dehydrogenase in benzoic acid biosynthesis. *Plant J.*, 2009, 59 (2), 256–265. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2009.03864.x.
- Malterud, K. E; Bremnes, T. E; Faegri, A; Moe, T; Dugstad, E. K. S; Anthonsen, T. und Henriksen, L. M. Flavonoids from the wood of *Salix caprea* as inhibitors of wood-destroying fungi. *J. Nat. Prod.*, 1985, 48 (4), 559–563. doi: 10.1021/np50040a007.
- Matthews, S; Mila, I; Scalbert, A; Pollet, B; Lapiere, C; Hervé du Penhoat, C.L.M; Rolando, C. und Donnelly D.M.X. Method for estimation of proanthocyanidins based on their acid depolymerization in the presence of nucleophiles. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45 (4), 1195–1201. doi: 10.1021/jf9607573.
- Meier, B; Julkunen-Tiitto, R; Tahvanainen, J. und Sticher, O. Comparative high-performance liquid and gas-liquid chromatographic determination of phenolic glucosides in salicaceae species. *J. Chromatogr. A*, 1988, 442, 175–186. doi: 10.1016/S0021-9673(00)94467-4.
- Meier, B; Lehmann, D; Sticher, O. und Bettschart, A. Identifikation und Bestimmung von je acht Phenolglykosiden in *Salix purpurea* und *Salix daphnoides* mit moderner HPLC. *Pharm. Acta Helv.*, 1985a, 60, 296–275.
- Meier, B; Lehmann, D; Sticher, O. und Bettschart, A. HPLC-Screening of naturally occurring salicylates. *Planta Med.*, 1986 (5), 424–425. doi: 10.1055/s-2007-969228.
- Meier, B. und Meier-Liebi, M. *Salix*, in: Blaschek, W., Hager, H. (Eds.), Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen, vol. 14, 6th ed. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2007, S. 81–115.

- Meier, B; Sticher, O. und Bettschart, A. Weidenrinden-Qualität: Gesamtsalicinbestimmung in Weidenrinden und Weidenpräparaten mit HPLC. *DAZ*, 1985b, *125* (7), 341–347.
- Mellway, R. D; Tran, L. T; Prouse, M. B; Campbell, M. M. und Constabel, C. P. The wound-, pathogen-, and ultraviolet B-responsive MYB134 gene encodes an R2R3 MYB transcription factor that regulates proanthocyanidin synthesis in poplar. *Plant Physiol.*, 2009, *150* (2), 924–941. doi: 10.1104/pp.109.139071.
- Mohri, Y; Sagehashi, M; Yamada, T; Hattori, Y; Morimura, K; Kamo, T; Hirota, M. und Makabe, H. An efficient synthesis of procyanidins. Rare earth metal Lewis acid catalyzed equimolar condensation of catechin and epicatechin. *Tetrahedron Lett.*, 2007, *48* (33), 5891–5894. doi: 10.1016/j.tetlet.2007.06.047.
- Muema, J. M; Bargul, J. L; Nyanjom, S. G; Mutunga, J. M. und Njeru, S. N. Potential of *Camellia sinensis* proanthocyanidins-rich fraction for controlling malaria mosquito populations through disruption of larval development. *Parasites Vectors*, 2016, *9* (1), 512. doi: 10.1186/s13071-016-1789-6.
- Nadpal, J. D; Lesjak, M. M; Sibul, F. S; Anackov, G. T; Cetojevic-Simin, D. D; Mimica-Dukic, N. M. und Beara, I. N. Comparative study of biological activities and phytochemical composition of two rose hips and their preserves: *Rosa canina* L. and *Rosa arvensis* Huds. *Food Chem.*, 2016, *192*, 907–914. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.07.089.
- Nahrstedt, A; Schmidt, M; Jäggi, R; Metz, J. und Khayyal, M. T. Willow bark extract: the contribution of polyphenols to the overall effect. *Wien. Med. Wochenschr.*, 2007, *157* (13-14), 348–351. doi: 10.1007/s10354-007-0437-3.
- Nesi, N; Jond, C; Debeaujon, I; Caboche, M. und Lepiniec, L. The *Arabidopsis* TT2 gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *The Plant cell*, 2001, *13* (9), 2099–2114.
- Newman, R. H; Porter, L. J; Foo, L. Y; Johns, S. R. und Willing, R. I. High-resolution¹³C NMR studies of proanthocyanidin polymers (condensed tannins). *Magn. Reson. Chem.*, 1987, *25* (2), 118–124. doi: 10.1002/mrc.1260250207.
- Nybakken, L. und Julkunen-Tiitto, R. Gender differences in *Salix myrsinifolia* at the pre-reproductive stage are little affected by simulated climatic change. *Physiol. Plant.*, 2013, *147* (4), 465–476. doi: 10.1111/j.1399-3054.2012.01675.x.

- Nyman, T. und Julkunen-Tiitto, R. Manipulation of the phenolic chemistry of willows by gall-inducing sawflies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, 97 (24), 13184–13187. doi: 10.1073/pnas.230294097.
- Nyman, T. und Julkunen-Tiitto, R. Chemical variation within and among six northern willow species. *Phytochemistry*, 2005, 66 (24), 2836–2843. doi: 10.1016/j.phytochem.2005.09.040.
- Oberdorfer, E. Pflanzensoziologische Exkursionsflora für Deutschland und angrenzende Gebiete, 8th ed. Ulmer, Stuttgart, 2001.
- Oberprieler, C; Dietz, L; Harlander, C. und Heilmann, J. Molecular and phytochemical evidence for the taxonomic integrity of *Salix alba*, *S. fragilis*, and their hybrid *S. × rubens* (Salicaceae) in mixed stands in SE Germany. *Plant. Syst. Evol.*, 2013, 299 (6), 1107–1118. doi: 10.1007/s00606-013-0782-1.
- Oliveira Caleare, A. d; Hensel, A; Mello, J. C. P; Pinha, A. B; Panizzon, G. P; Lechtenberg, M; Petereit, F. und Nakamura, C. V. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Limonium brasiliense* inhibit the adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to epithelial host cells by interaction with gingipains. *Fitoterapia*, 2017, 118, 87–93. doi: 10.1016/j.fitote.2017.03.002.
- Orians, C. M. Preserving leaves for tannin and phenolic glycoside analyses: a comparison of methods using three willow taxa. *J. Chem. Ecol.*, 1995, 21 (9), 1235–1243. doi: 10.1007/BF02027558.
- Orians, C. M. The effects of hybridization in plants on secondary chemistry: implications for the ecology and evolution of plant-herbivore interactions. *Am. J. Bot.*, 2000, 87 (12), 1749–1756.
- Orians, C. M. und Fritz, R. S. Secondary chemistry of hybrid and parental willows: phenolic glycosides and condensed tannins in *Salix sericea*, *S. eriocephala*, and their hybrids. *J. Chem. Ecol.*, 1995, 21 (9), 1245–1253. doi: 10.1007/BF02027559.
- Orians, C. M; Griffiths, M. E; Roche, B. M. und Fritz, R. S. Phenolic glycosides and condensed tannins in *Salix sericea*, *S. eriocephala* and their F1 hybrids: not all hybrids are created equal. *Biochem. Syst. Ecol.*, 2000, 28 (7), 619–632.

- Orlofsky, E. M; Kozhoridze, G; Lyubenova, L; Ostrozhenkova, E; Winkler, J. B; Schröder, P; Bacher, A; Eisenreich, W; Guy, M. und Golan-Goldhirsch, A. Sexual dimorphism in the response of *mercurialis annua* to stress. *Metabolites*, 2016, 6 (2). doi: 10.3390/metabo6020013.
- Orlova, I; Marshall-Colón, A; Schnepf, J; Wood, B; Varbanova, M; Fridman, E; Blakeslee, J. J; Peer, W. A; Murphy, A. S; Rhodes, D; Pichersky, E. und Dudareva, N. Reduction of benzenoid synthesis in petunia flowers reveals multiple pathways to benzoic acid and enhancement in auxin transport. *The Plant cell*, 2006, 18 (12), 3458–3475. doi: 10.1105/tpc.106.046227.
- Paaajanen, R; Julkunen-Tiitto, R; Nybakken, L; Petrelius, M; Tegelberg, R; Pusenius, J; Rousi, M. und Kellomäki, S. Dark-leaved willow (*Salix myrsinifolia*) is resistant to three-factor (elevated CO₂, temperature and UV-B-radiation) climate change. *The New phytologist*, 2011, 190 (1), 161–168. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03583.x.
- Pearl, I. A. und Darling, S. F. Phenolic extractives of *Salix purpurea* bark. *Phytochemistry*, 1970, 9 (6), 1277–1281. doi: 10.1016/S0031-9422(00)85319-4.
- Pearl, I. A. und Darling, S. F. The structures of salicortin and tremulacin. *Phytochemistry*, 1971, 10 (12), 3161–3166. doi: 10.1016/S0031-9422(00)97369-2.
- Peters, D. J. und Constabel, C. P. Molecular analysis of herbivore-induced condensed tannin synthesis: cloning and expression of dihydroflavonol reductase from trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Plant J.*, 2002, 32 (5), 701–712.
- Poblocka-Olech, L. und Krauze-Baranowska, M. SPE-HPTLC of procyanidins from the barks of different species and clones of *Salix*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, 48 (3), 965–968. doi: 10.1016/j.jpba.2008.05.039.
- Poblocka-Olech, L; Krauze-Baranowska, M; Glod, D; Kawiak, A. und Lojkowska, E. Chromatographic analysis of simple phenols in some species from the genus *Salix*. *Phytochem. Anal.*, 2010, 21 (5), 463–469. doi: 10.1002/pca.1220.
- Pobłocka-Olech, L. und Krauze-Baranowska, M. SPE-HPTLC of procyanidins from the barks of different species and clones of *Salix*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, 48 (3), 965–968. doi: 10.1016/j.jpba.2008.05.039.

- Pobłocka-Olech, L; van Nederkassel, A.-M; Vander Heyden, Y; Krauze-Baranowska, M; Glód, D. und Baczek, T. Chromatographic analysis of salicylic compounds in different species of the genus *Salix*. *J. Sep. Sci.*, 2007, 30 (17), 2958–2966. doi: 10.1002/jssc.200700137.
- Pohjamo, S. P; Hemming, J. E; Willför, S. M; Reunanen, M. H. T. und Holmbom, B. R. Phenolic extractives in *Salix caprea* wood and knots. *Phytochemistry*, 2003, 63 (2), 165–169.
- Porter, L. J. Condensed Tannins, in: Rowe, J.W. (Ed.), Natural products of woody plants. Chemicals extraneous to the lignocellulosic cell wall. Springer Verlag, Berlin, 1989, S. 651–690.
- R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2017. URL <https://www.R-project.org/>. Zuletzt geprüft am 17.06.2017.
- Rehill, B; Clauss, A; Wieczorek, L; Whitham, T. und Lindroth, R. Foliar phenolic glycosides from *Populus fremontii*, *Populus angustifolia*, and their hybrids. *Biochem. Syst. Ecol.*, 2005, 33 (2), 125–131. doi: 10.1016/j.bse.2004.06.004.
- RStudio Team. RStudio: integrated development for R. RStudio, Inc., 2016. URL <http://www.rstudio.org>. Zuletzt geprüft am 17.06.2017.
- Rücker, G; Neugebauer, M. und Willems, G. G. Instrumentelle pharmazeutische Analytik: Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmethoden; mit 81 Tabellen, 4th ed. Wiss. Verl.-Ges, Stuttgart, 2008.
- Ruuhola, T. und Julkunen-Tiitto, R. Trade-off between synthesis of salicylates and growth of micropropagated *Salix pentandra*. *J. Chem. Ecol.*, 2003, 29 (7), 1565–1588.
- Safer, S; Cicek, S. S; Pieri, V; Schwaiger, S; Schneider, P; Wissemann, V. und Stuppner, H. Metabolic fingerprinting of *Leontopodium* species (Asteraceae) by means of ¹H NMR and HPLC-ESI-MS. *Phytochemistry*, 2011, 72 (11-12), 1379–1389. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.04.006.
- Saito, A; Mizushina, Y; Tanaka, A. und Nakajima, N. Versatile synthesis of epicatechin series procyanidin oligomers, and their antioxidant and DNA polymerase inhibitory activity. *Tetrahedron*, 2009, 65 (36), 7422–7428. doi: 10.1016/j.tet.2009.07.018.

- Saito, A; Nakajima, N; Tanaka, A. und Ubukata, M. Synthetic studies of proanthocyanidins. Part 2: Stereoselective gram-scale synthesis of procyanidin-B3. *Tetrahedron*, 2002, 58 (39), 7829–7837. doi: 10.1016/S0040-4020(02)00936-5.
- Saito, A; Nakajima, N; Tanaka, A. und Ubukata, M. Synthetic studies of proanthocyanidins. Part 4. The synthesis of procyanidin B1 and B4: TMSOTf-catalyzed cyclization of catechin and epicatechin condensation. *Heterocycles*, 2003, 61 (1), 287. doi: 10.3987/COM-03-S37.
- Saito, A; Tanaka, A; Ubukata, M. und Nakajima, N. Efficient stereoselective synthesis of proanthocyanidin trimers with -TMSOTf-catalyzed intermolecular condensation. *Synlett*, 2004 (6), 1069–1073. doi: 10.1055/s-2004-822905.
- Salicis cortex, in: E/S/C/O/P monographs. The scientific foundation for herbal medicinal products, 2nd ed. European Scientific Cooperative on Phytotherapy; Thieme, Exeter, U.K., Stuttgart, Germany, New York, 2003, S. 445–451.
- Schmeil, O. und Fitschen, J. Die Flora Deutschlands und der angrenzenden Länder: Ein Buch zum Bestimmen aller wildwachsenden und häufig kultivierten Gefäßpflanzen, 96th ed. Quelle & Meyer Verlag, Wiebelsheim, 2016.
- Schmid, B; Kotter, I. und Heide, L. Pharmacokinetics of salicin after oral administration of a standardised willow bark extract. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 2001a, 57 (5), 387–391.
- Schmid, B; Lüdtkke, R; Selbmann, H. K; Kötter, I; Tschirdewahn, B; Schaffner, W. und Heide, L. Efficacy and tolerability of a standardized willow bark extract in patients with osteoarthritis: randomized placebo-controlled, double blind clinical trial. *Phytother. Res.*, 2001b, 15 (4), 344–350.
- Schütt, P. und Lang, U. M. *Salix purpurea*, in: Stimm, B., Roloff, A., Lang, U.M., Weisgerber, H. (Eds.), Enzyklopädie der Holzgewächse. Handbuch und Atlas der Dendrologie. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2014.
- Scioneaux, A. N; Schmidt, M. A; Moore, M. A; Lindroth, R. L; Wooley, S. C. und Hagerman, A. E. Qualitative variation in proanthocyanidin composition of *Populus* species and hybrids: genetics is the key. *J. Chem. Ecol.*, 2011, 37 (1), 57–70. doi: 10.1007/s10886-010-9887-y.
- Shao, Y. Phytochemischer Atlas der Schweizer Weiden. Dissertation. ETH Zürich, Zürich, 1991.

- Shara, M. und Stohs, S. J. Efficacy and safety of white willow bark (*Salix alba*) extracts. *Phytother. Res.*, 2015, 29 (8), 1112–1116. doi: 10.1002/ptr.5377.
- Sharma, S. B. und Dixon, R. A. Metabolic engineering of proanthocyanidins by ectopic expression of transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 2005, 44 (1), 62–75. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02510.x.
- Shoji, T; Mutsuga, M; Nakamura, T; Kanda, T; Akiyama, H. und Goda, Y. Isolation and Structural Elucidation of Some Procyanidins from Apple by Low-Temperature Nuclear Magnetic Resonance. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51 (13), 3806–3813. doi: 10.1021/jf0300184.
- Skvortsov, A. K. und Zinovjev, A. G. Willows of Russia and adjacent countries: Taxonomical and geographical revision. University of Joensuu, Joensuu, Finland, 1999.
- Sonboli, A; Mojarrad M; Ebrahimi S. N. und Enayat S. H. Free radical scavenging activity and total phenolic content of methanolic extracts from male inflorescence of *Salix aegyptiaca* Grown in Iran. *Iran. J. Pharm. Res.*, 2010, 9 (3), 293–296.
- Spiegler, V; Liebau, E. und Hensel, A. Medicinal plant extracts and plant-derived polyphenols with anthelmintic activity against intestinal nematodes. *Nat. Prod. Rep.*, 2017, 34 (6), 627–643. doi: 10.1039/c6np00126b.
- Spiegler, V; Liebau, E; Pepler, C; Raue, K; Werne, S; Strube, C; Heckendorn, F; Agyare, C; Stark, T; Hofmann, T. und Hensel, A. A hydroalcoholic extract from *Paullinia pinnata* L. roots exerts anthelmintic activity against free-living and parasitic nematodes. *Planta Med.*, 2016, 82 (13), 1173–1179. doi: 10.1055/s-0042-108209.
- Stace, C. A; Preston, C. D. und Pearman, D. A. Hybrid flora of the British Isles. Botanical Society of Britain & Ireland, Bristol, 2015.
- Steele, J. W; Bolan, M. und Audette, R. C. Phytochemistry of the Salicaceae. II. The effect of extraction procedures on the apparent free phenolic glycoside content of *Salix* species. *J. Chromatogr.*, 1969, 40 (3), 370–376.
- Steele, J. W; Weitzel, P. F. und Audette, R.C.S. Phytochemistry of the Salicaceae: IV. Investigation of the bark of *Salix petiolaris* SM. *J. Chromatogr. A*, 1972, 72 (3), 435–441. doi: 10.1016/S0021-9673(01)91896-5.

- Sticher, O; Egloff, C. und Bettschart, A. Isolierung und quantitative Bestimmung von Phenolglykosiden aus *Salix*-Species. *Planta Med.*, 1981, 42 (6), 126–127. doi: 10.1055/s-2007-971590.
- Stoupi, S; Williamson, G; Viton, F; Barron, D; King, L. J; Brown, J. E. und Clifford, M. N. *In vivo* bioavailability, absorption, excretion, and pharmacokinetics of [¹⁴C]procyanidin B2 in male rats. *Drug Metab. & Dispos.*, 2010, 38 (2), 287–291. doi: 10.1124/dmd.109.030304.
- Sulima, P; Krauze-Baranowska, M. und Przyborowski, J. A. Variations in the chemical composition and content of salicylic glycosides in the bark of *Salix purpurea* from natural locations and their significance for breeding. *Fitoterapia*, 2017, 118, 118–125. doi: 10.1016/j.fitote.2017.03.005.
- Tahvanainen, J; Helle, E; Julkunen-Tiitto, R. und Lavola, A. Phenolic compounds of willow bark as deterrents against feeding by mountain hare. *Oecologia*, 1985, 65 (3), 319–323. doi: 10.1007/BF00378905.
- Taubert, D; Berkels, R; Grosser, N; Schröder, H; Gründemann, D. und Schömig, E. Aspirin induces nitric oxide release from vascular endothelium: a novel mechanism of action. *Br. J. Pharmacol.*, 2004, 143 (1), 159–165. doi: 10.1038/sj.bjp.0705907.
- Tegelberg, R. und Julkunen-Tiitto, R. Quantitative changes in secondary metabolites of dark-leaved willow (*Salix myrsinifolia*) exposed to enhanced ultraviolet-B radiation. *Physiol. Plant.*, 2001, 113 (4), 541–547. doi: 10.1034/j.1399-3054.2001.1130413.x.
- Thieme, H. Die Phenolglykoside der Salicaceen. 1. Allgemeine Übersicht. *Pharmazie*, 1963, 18 (11), 770–774.
- Thieme, H. Die Phenolglykoside der Salicaceen. 2. Isolierung und Nachweis. *Pharmazie*, 1964a, 19, 471–475.
- Thieme, H. Die Phenolglykoside der Salicaceen. 3. Quantitative Bestimmung. *Pharmazie*, 1964b, 19, 535–538.
- Thieme, H. Isolierung eines neuen Phenolglucosids aus *Salix purpurea* L. *Pharmazie*, 1964c, 19, 725.
- Thieme, H. Die Phenolglykoside der Salicaceen. 4. Übersicht über neu isolierte Glykoside und neuere Arbeiten zur Strukturaufklärung; Nachweis und Bestimmung der neuen Glykoside. *Pharmazie*, 1965a, 20 (7), 436–439.

- Thieme, H. Die Phenolglykoside der Salicaceen. 5. Untersuchungen über die Glykosidspektren und den Glykosidgehalt der mitteldeutschen Salixarten. *Pharmazie*, 1965b, 20 (9), 570–574.
- Thieme, H. Die Phenolglykoside der Salicaceen. 6. Untersuchungen über die jahreszeitlich bedingten Veränderungen der Glykosidkonzentrationen, über die Abhängigkeit des Glykosidgehalts von der Tageszeit und vom Alter der Pflanzenorgane. *Pharmazie*, 1965c, 20 (11), 688–691.
- Thieme, H., 1965d. Die Phenolglykoside der Salicaceen. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, 8 June 1965, Hamburg.
- Thieme, H. Über den Gerbstoffgehalt der Weidenrinde. *Pharmazie*, 1968, 23 (4), 212.
- Thieme, H. Über die Identität der Glucoside Rhodiolosid und Salidroside. *Pharmazie*, 1969, 24 (2), 118–119.
- Thompson, R. S; Jacques, D; Haslam, E. und Tanner, R. J. N. Plant proanthocyanidins. Part I. Introduction; the isolation, structure, and distribution in nature of plant procyanidins. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1972, 1387–1399. doi: 10.1039/P19720001387.
- Torp, M; Lehrman, A; Stenberg, J. A; Julkunen-Tiitto, R. und Björkman, C. Performance of an herbivorous leaf beetle (*Phratora vulgatissima*) on Salix F2 hybrids: the importance of phenolics. *J. Chem. Ecol.*, 2013, 39 (4), 516–524. doi: 10.1007/s10886-013-0266-3.
- Totland, O. und Sottocornola, M. Pollen limitation of reproductive success in two sympatric alpine willows (Salicaceae) with contrasting pollination strategies. *Am. J. Bot.*, 2001, 88 (6), 1011–1015.
- Trybush, S; Jahodová, Š; Macalpine, W. und Karp, A. A genetic study of a *Salix* germplasm resource reveals new insights into relationships among subgenera, sections and species. *Bioenerg. Res.*, 2008, 1 (1), 67–79. doi: 10.1007/s12155-008-9007-9.
- Turtola, S; Rousi, M; Pusenius, J; Yamaji, K; Heiska, S; Tirkkonen, V; Meier, B. und Julkunen-Tiitto, R. Clone-specific responses in leaf phenolics of willows exposed to enhanced UVB radiation and drought stress. *Global Change Biol.*, 2005, 11 (10), 1655–1663. doi: 10.1111/j.1365-2486.2005.01013.x.

- Ulrich-Merzenich, G; Kelber, O; Koptina, A; Freischmidt, A; Heilmann, J; Müller, J; Zeitler, H; Seidel, M. F; Ludwig, M; Heinrich, E. U. und Winterhoff, H. Novel neurological and immunological targets for salicylate-based phytopharmaceuticals and for the anti-depressant imipramine. *Phytomedicine*, 2012, 19 (10), 930–939. doi: 10.1016/j.phymed.2012.05.004.
- Vanderplanck, M; Moerman, R; Rasmont, P; Lognay, G; Wathelet, B; Wattiez, R. und Michez, D. How does pollen chemistry impact development and feeding behaviour of polylectic bees? *PloS one*, 2014, 9 (1), e86209. doi: 10.1371/journal.pone.0086209.
- Vlachojannis, J; Magora, F. und Chrubasik, S. Willow species and aspirin: different mechanism of actions. *Phytother Res*, 2011, 25 (7), 1102–1104. doi: 10.1002/ptr.3386.
- Wagner, S; Ureña, A; Reich, E. und Merfort, I. Validated HPTLC methods for the determination of salicin in *Salix* sp. and of harpagoside in *Harpagophytum* corrected *procumbens*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, 48 (3), 587–591. doi: 10.1016/j.jpba.2008.05.030.
- Wahid, A; Hamed, A. N; Eltahir, H. M. und Abouzied, M. M. Hepatoprotective activity of ethanolic extract of *Salix subserrata* against CCl₄-induced chronic hepatotoxicity in rats. *BMC Complementary Altern. Med.*, 2016, 16, 263. doi: 10.1186/s12906-016-1238-2.
- Weidenrinde: Salicis cortex, in: Europäisches Arzneibuch 8. Ausgabe, 2. Nachtrag (Ph.Eur. 8.2). Amtliche deutsche Ausgabe, 1st ed. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 2015, S. 2135–2136.
- Weiner, J. pca3d: three dimensional PCA plots. R package version 0.10., 2017. URL <https://CRAN.R-project.org/package=pca3d>.
- Weißdornfrüchte: Crataegi fructus, in: Europäisches Arzneibuch 7. Ausgabe, 7th ed. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 2011, S. 1933–1934.
- Williamson, E. M. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*, 2001, 8 (5), 401–409. doi: 10.1078/0944-7113-00060.
- Wink, M. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoret. Appl. Genetics*, 1988, 75 (2), 225–233. doi: 10.1007/BF00303957.
- Winkel-Shirley, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.*, 2001, 126 (2), 485–493.

- Wu, J; Nyman, T; Wang, D.-C; Argus, G. W; Yang, Y.-P. und Chen, J.-H. Phylogeny of *Salix* subgenus *Salix* s.l. (Salicaceae): delimitation, biogeography, and reticulate evolution. *BMC Evol. Biol.*, 2015, 15, 15:31. doi: 10.1186/s12862-015-0311-7.
- Zapesochnaya, G. G; Kurkin, V. A; Braslavskii, V. B. und Filatova, N. V. Phenolic compounds of *Salix acutifolia* bark. *Chem Nat Compd*, 2002, 38 (4), 314–318. doi: 10.1023/A:1021661621628.
- Zenk, M. H. Pathways of salicyl alcohol and salicin formation in *Salix purpurea* L. *Phytochemistry*, 1967, 6 (2), 245–252. doi: 10.1016/S0031-9422(00)82770-3.
- Zhang, Z; Kou, X; Fugal, K. und McLaughlin, J. Comparison of HPLC methods for determination of anthocyanins and anthocyanidins in bilberry extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52 (4), 688–691. doi: 10.1021/jf034596w.
- Zheng, Y.-n; Zhang, J; Han, L.-K; Sekiya, K; Kimura, Y. und Okuda, H. Effects of compounds in leaves of *Salix matsudana* on arachidonic acid metabolism. *Yakugaku zasshi*, 2005, 125 (12), 1005–1008.